SYNTHESE UND BIOLOGISCHE WIRKSAMKEIT EINIGER CYCLOPHOSPHAMID-DERIVATE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Quack

aus Köln

1983

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE WIRKSAMKEIT EINIGER CYCLOPHOSPHAMID-DERIVATE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Günter Quack

aus Köln

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Eisele
2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weber

A B S T R A C T

QUACK, GÜNTER

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE WIRKSAMKEIT EINIGER CYCLOPHOSPHAMID-DERIVATE

Cyclophosphamid (2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid) und mehrere an N-3 reversibel geschützte Derivate werden synthetisiert. Die Darstellung von Cyclophosphamid, 3-Benzyl-cyclophosphamid und 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid erfolgt durch Umsetzung von Phosphoroxychlorid mit 3-Aminopropanol-(1) bzw. dessen Derivaten N-Benzyl- und N-(2,4-Dimethoxy)benzyl-3-aminopropanol-(1). Zur Synthese von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid wird Cyclophosphamid mit Phenylsulfenylchlorid umgesetzt; 3-t-Butyloxycarbonyl-cyclophosphamid wird durch Reaktion von Cyclophosphamid mit t-Butyloxycarbonyl-azid in Gegenwart von metallischem Natrium dargestellt. Die Verbindungen werden nach Auflösung in Chloroform bzw. Zugabe von Dibenzoylperoxid und Pyridin einer Chlorierung unterworfen. Es können neben einigen nur partiell charakterisierbaren Substanzen 3-Chlor-cyclophosphamid und 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid isoliert werden. Die Umsetzung der verschiedenen Chlorierungsgemische mit Thiophenol führt zur Synthese von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid. Die dargestellten Verbindungen und das nach Reaktion von Cyclophosphamid mit metallischem Natrium isolierte 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino[2,1-b]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid werden in einem in-vivo Test (Ehrlich-Ascites-Tumor-Carcinom der Maus) auf cancerostatische Wirksamkeit untersucht. Danach ist für die N-3 bzw. N-3/C-4 substituierten Cyclophosphamid-Derivate bei relativ hoher Allgemeintoxizität eine Cyclophosphamid vergleichbare Wirkung auszuschließen.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Diese Arbeit wurde am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. K. Eisele danke ich dafür, daß ich nach Ausscheiden von Prof. Weitzel die Arbeit unter seiner Leitung fortführen konnte.

Zu Dank verpflichtet bin ich ferner den Service-Abteilungen des Physiologisch-chemischen Instituts und des Instituts für Organische Chemie für die Anfertigung von Elementaranalysen, ^{13}C-NMR-, ^{1}H-NMR- und FD-Massen-Spektren, Herrn Dr. Weller für die Anfertigung von IR-Spektren sowie Herrn Dr. Jung für die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Laborkollegen Herrn Dipl.-Biochem. E. Hochschild für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

ABKÜRZUNGEN

Die Bezeichnungen organischer Verbindungen richtet sich nach den Nomenklaturvorschlägen der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry "Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B and C", London 1971).

Die Abkürzungen für Aminosäure- bzw. Peptidschutzgruppen entsprechen den von der IUPAC-IUB herausgegebenen Empfehlungen (IUPAC-IUB-Tentative Rules, Comission on Biochemical Nomenclature (1967), Z. Physiol. Chem. 348, 256).

Zur Abkürzung der Tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-Derivate wurden die im internationalen Schrifttum üblichen Trivialnamen verwendet:

Cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-Chlor-cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-3-chlor-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-3-ethyl-4-phenylsulfenyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-Benzyl-cyclophosphamid = 3-Benzyl-2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-3-(2,4-dimethoxy)benzyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-3-ethoxymethyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-3-phenylsulfenyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

3-t-BOC-cyclophosphamid = 2-[Bis(2-chlorethyl)amino]-3-tert. butyloxycarbonyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

Darüberhinaus wurden noch folgende Abkürzungen verwendet:

EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethylalkohol
MeOH	Methylalkohol

NBP	4-(4-Nitrobenzyl)pyridin
PE	Petrolether,Kp.: 60-90°C
TEA	Triethylamin
Ether	Diethylether
TMS	Tetramethylsilan
st	Streckschwingung
def	Deformationsschwingung
as	asymmetrisch
m	Multiplett
DC	Dünnschichtchromatographie
UV	Fluoreszenzabsorption bei 254 nm
EATC	Ehrlich-Ascites-Tumor-Carcinom

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	6
2.1.	Materialien	6
2.2.	Angewandte Analysenverfahren	7
2.3.	Chlorierung	8
2.4.	Umsetzung mit Thiophenol	8
2.5.	Trockensäulenchromatographie	9
2.6.	Tests auf cancerostatische Wirksamkeit in-vivo	10
3.	SYNTHESEN	12
3.1.	Untersuchungen zur Derivatisierung von Cyclophosphamid	12
3.1.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen	12
3.1.2.	Chlorierung von Cyclophosphamid	16
3.1.2.1.	Darstellung, Isolierung und Charakterisierung von 3-Chlor-cyclophosphamid	16
3.1.2.2.	Untersuchungen zur Dehydrohalogenierung von 3-Chlor-cyclophosphamid	20
3.1.2.3.	Darstellung und Isolierung eines weiteren Chlorierungsprodukts	22
3.1.3.	Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.1.2. mit Thiophenol	23
3.1.3.1.	Darstellung, Isolierung und Charakterisierung von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamids	24
3.2.	Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-Benzyl-cyclophosphamid	29
3.2.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen	29
3.2.2.	Chlorierung von 3-Benzyl-cyclophosphamid	36
3.2.3.	Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.2.2. mit Thiophenol	36
3.3.	Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid	36

3.3.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen	36
3.3.2.	Chlorierung von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid	42
3.3.2.1.	Darstellung, Isolierung und Charakterisierung von 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid	42
3.3.3.	Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.3.2. mit Thiophenol	46
3.4.	Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid	47
3.4.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen	47
3.4.2.	Chlorierung von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid	51
3.4.2.1.	Darstellung, Isolierung und partielle Charakterisierung eines Chlorierungsprodukts	51
3.4.3.	Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.4.2. mit Thiophenol	57
3.5.	Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-t-BOC-cyclophosphamid	57
3.5.1.	Synthese der Ausgangsverbindungen	57
3.5.2.	Chlorierung von 3-t-BOC-cyclophosphamid	62
3.5.3.	Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.5.2. mit Thiophenol	63
3.5.4.	Darstellung und Charakterisierung von 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino[2,1-b]-tetrahydro 2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid	63
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER SYNTHESEN	70
4.1.	Analysenverfahren	70
4.2.	Methodik der Chlorierung	70
4.3.	Cyclophosphamid	72
4.3.1.	Chlorierung	72
4.3.2.	Umsetzung mit Thiophenol	73
4.4.	N-3 geschützte Cyclophosphamid-Derivate	73
4.4.1.	Schutzgruppen	73
4.4.2.	Chlorierung	75
4.4.3.	Umsetzung mit Thiophenol	76

5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER BIOLOGISCHEN TESTS	77
5.1.	Methodik	77
5.2.	Auswertung der Ergebnisse	80
6.	ZUSAMMENFASSUNG	86
7.	LITERATUR	88

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Zusammenhang mit der Entwicklung cytostatisch wirksamer alkylierender Substanzen wurden drei Konzepte angewandt (1).

- "drug latentiation"

  Darunter versteht man die Entwicklung von verzögert wirksamen Substanzen, die aufgrund ihrer relativ hohen biologischen Halbwertzeit im Organismus erst nach Eindringen in die Zielzelle ihre Cytotoxizität entwickeln.

- "drug delivery"

  Um die an sich geringe Spezifität der Cytostatika zu erhöhen, werden diese an einen Carrier gebunden, der möglichst weitgehend tumorzellspezifisch ist.

- "transport form/active form"

  Hier wird das aktive Agens erst durch Metabolisierung im Organismus aus einer nicht wirksamen Form dargestellt.

Das Prinzip "transport form/active form" hat eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Cyclophosphamid, dem wohl am häufigsten angewandten Cytostatikum der Gruppe der Alkylantien, gespielt.

Leider ist auch Cyclophosphamid, ähnlich den meisten Cytostatika, zellzyklusspezifisch und damit wenig selektiv, da sowohl Tumorzellen mit hohen Proliferationsraten als auch normale, besonders schnell wachsende Zellen, z.B. des Knochenmarks oder des Gastrointestinaltrakts in ihrem Wachstum retardiert bzw. abgetötet werden können (2).

Die Anwendung des "drug delivery"-Prinzips hatte im Zusammenhang mit anderen Cytostatika nicht den erwünschten Erfolg gezeitigt. Ein dabei immer wieder beobachtbares Hemmnis ist die Tatsache, daß durch die Bindung der Cytostatika an den Carrier deren Wirksamkeit erheblich beeinflußt wird; d.h., von einem geeigneten Carrier müßte nicht nur genügend Tumorzellspezifität erwartet werden können, sondern er sollte auch in der Zielzelle die wirksame Substanz unverändert aus der Bindung entlassen.

Diese Voraussetzung könnte aufgrund des Metabolismus von Cyclophosphamid und einem damit verknüpften Nebenweg der Detoxifikation über die Reaktion mit Thiolen gegeben sein, sodaß sich durch Einbeziehung des zweiten Konzepts

das Wirkungsspektrum erheblich erweitern ließe.

Ich möchte daher im folgenden die Grundzüge des Stoffwechsels von Cyclophosphamid skizzieren, um so besser den Ansatz der vorliegenden Arbeit verdeutlichen zu können (siehe dazu auch Abb. 1).

Cyclophosphamid (I), ein cyclischer Phosphamidester, wurde 1958 von ARNOLD und BOURSEAUX (3) synthetisiert. Die Substanz selbst zeigt praktisch keine cytotoxische Aktivität, wie in-vitro Versuche (4) zeigen konnten. Erst die metabolische Aktivierung durch mikrosomale Oxidation in der Leber (4-9) führt zu einer Reihe wirksamer Verbindungen.

Als Hauptweg des Metabolismus wird die Oxidation an C-4 angenommen, da 4-Ketocyclophosphamid (IV) und das tautomere Carboxycyclophosphamid (V) im Urin von Tieren (10-13) bzw. als einzymkatalysierte Oxidationsprodukte in in-vitro Experimenten (14,15) nachgewiesen werden konnten.

Die relativ geringe cytotoxische Wirksamkeit dieser Verbindungen weist aber auf eine Aktivierung in einer früheren Phase der C-4 Oxidation hin. Es werden daher heute die C-4 Metaboliten 4-Hydroxycyclophosphamid (II) bzw. die tautomere offenkettige Form Aldophosphamid (III) als die ersten Metaboliten betrachtet, die sowohl in-vivo als auch in-vitro aktiv sind (14-17).

Die Verbindungen II bzw. III zerfallen unter physiologischen Bedingungen spontan in die Fragmente Acrolein (VII) und N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphorsäurediamid (VI) (18-22).

Aufgrund der Cytotoxizität beider Substanzen wurden beide als die letztendlich wirksamen Stoffe angesehen, die entweder unabhängig voneinander oder in konzertierter Aktion die Antitumoraktivität bedingen, wenn sie intrazellulär von II bzw. III freigesetzt werden (18-23). Neuere Ergebnisse (24) deuten allerdings darauf hin, daß N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphorsäurediamid (VI) allein für die alkylierende und cytotoxische Wirkung von Cyclophosphamid verantwortlich ist.

Mehrere Beobachtungen über die Verminderung der akuten Toxizität von Cyclophosphamid durch protektive Gabe von Cystein (25), Cysteamin (26) oder Disulfiram (27) sowie in-vitro Untersuchungen mit N-Acetylcystein (28) zeigen eine deutliche Beeinflussung des Stoffwechsels von Cyclophosphamid durch Thiole. HOHORST et al. konnten zeigen, daß eine mögliche Erklärung dafür die Reaktion von 4-Hydroxycyclophpsphamid mit Thiolen unter Bildung von

4-(S-R)-Mercapto-Derivaten von Cyclophosphamid (VIII) ist (29). Der Nachweis, daß eine solche Reaktion möglich ist, gelang dann durch Synthese mehrerer derartiger Verbindungen (30). Aufgrund weiterer Synthesen (31) konnte nachgewiesen werden, daß zumindest teilweise so die Möglichkeit besteht, die oben erwähnten Konzepte "drug latentiation" und "drug delivery" auf diese Verbindungsklasse anzuwenden.

- Die Bildung cytotoxischer Verbindungen durch die Reaktion

  4-(S-R)-Mercapto-cyclophosphamid + H_2O ⟶

  4-Hydroxycyclophosphamid + HSR

  verläuft relativ langsam (30), sodaß durch geeignete Wahl der Thiolverbindung die Möglichkeit besteht, eine Wirkungsverzögerung in ausreichendem Maße zu erreichen.

- Kopplung von tumorzellspezifischen Monomeren oder Polymeren an derartig derivatisierte Cyclophosphamidmoleküle würde die Freisetzung von cytotoxischen Verbindungen in der Zielzelle nicht behindern.

Das zur Darstellung der 4-(S-R)-Mercapto-cyclophosphamid (VIII) angewandte Verfahren (30) wurde konzipiert, um den in Abb. 1 skizzierten Stoffwechselweg durch chemische Synthese der postulierten Verbindungen verifizieren zu können.

Ausgegangen wird dabei von der Synthese von 4-Hydroxycyclophosphamid (II), welches durch Ozonisierung von Cyclophosphamid mit anschließender Reduktion des isolierbaren Zwischenprodukts 4-Hydroperoxycyclophosphamid erhalten wird. 4-Hydroxycyclophosphamid ist allerdings sehr instabil und wird daher nicht isoliert, sondern erst unmittelbar vor der Umsetzung mit Mercaptanen dargestellt.

Dieses Verfahren ist unter präparativen Gesichtspunkten nicht sehr effektiv, da

- die Ausbeute an 4-Hydroperoxycyclophosphamid, bezogen auf das stabile kristallisierbare Diastereomer, maximal 20% beträgt;

- unter den zur Umsetzung mit Mercaptanen angegebenen Reaktionsbedingungen zu erwarten ist, daß 4-Hydroxycyclophosphamid im Gleichgewicht mit dem offenkettigen Aldophosphamid (III) steht, was bei Einsatz bifunktioneller Mercaptane (z.B. Cysteamin) Anlaß zu erheblichen Nebenreaktionen

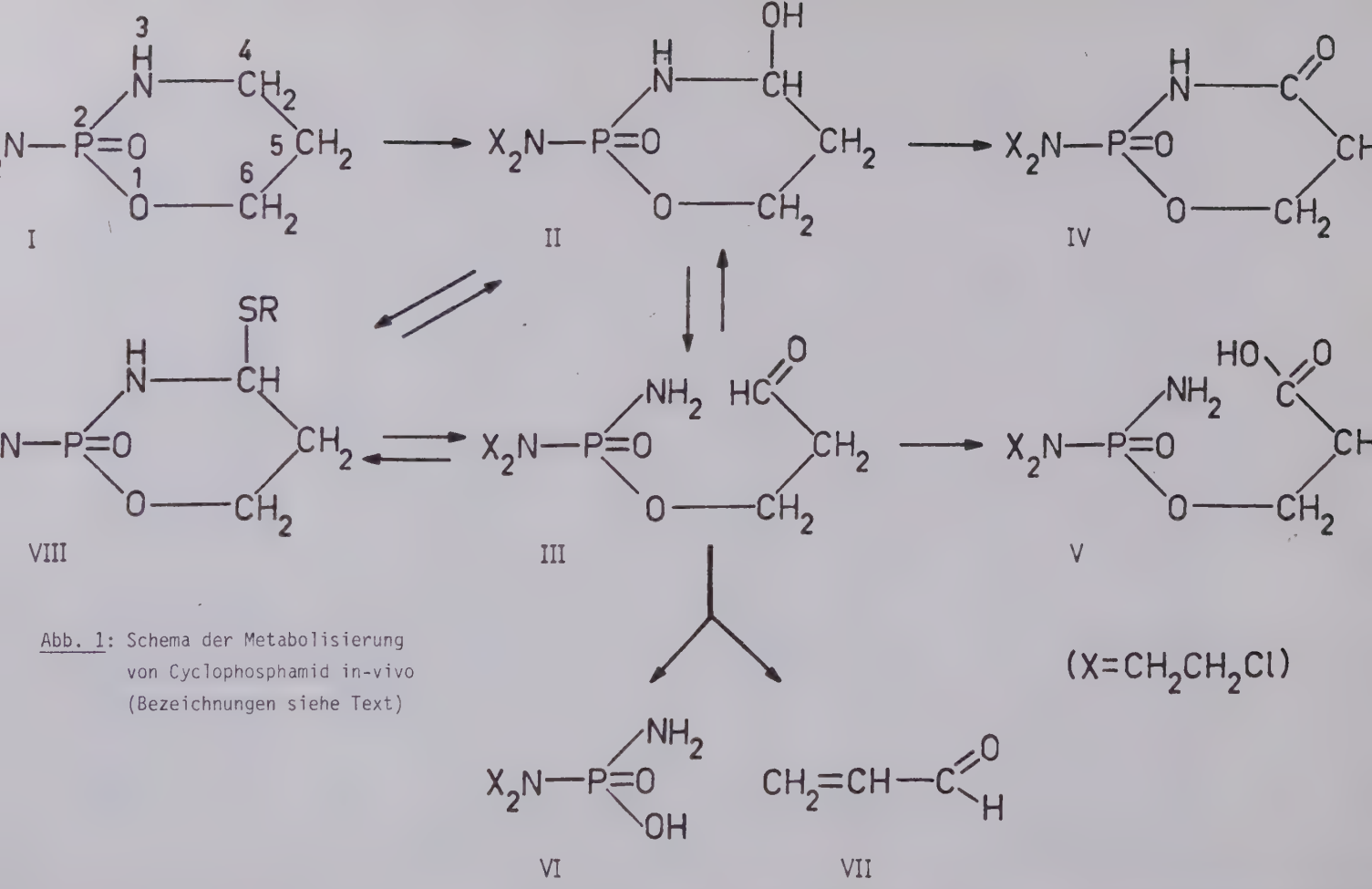


Abb. 1: Schema der Metabolisierung von Cyclophosphamid in-vivo (Bezeichnungen siehe Text)

(z.B. Bildung von Enaminen) sein kann.

Es wurde daher überlegt, inwieweit die Darstellung von 4-Hydroxycyclophosphamid umgangen werden kann, indem man die C-4 Position auf andere Weise aktiviert.

Aufgrund der Vermutung, daß das aktive Agens der oben dargelegten Ozonisierungsreaktion Singlett-O_2 ist (30), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit eine radikalische Halogenierung (hier: Chlorierung) von Cyclophosphamid eine Synthese von 4-Chlor-cyclophosphamid ermöglicht. Derartige α-Chloramide sollten höchst reaktiv sein (32) und sich gut substituieren lassen, ohne Nebenreaktionen oben beschriebener Art einzugehen.

Es war aber zu erwarten, daß

- die Labilität der α-Chloramide zu groß ist, um sie zu isolieren;
- eine direkte Chlorierung von Cyclophosphamid zunächst zu einer Substitution an N-3 führen wird.

Um zu verhindern, daß, bedingt durch die Reaktivität der α-Chloramide, deren Charakterisierung unmöglich ist, wurden die Reaktionsprodukte der Chlorierungen direkt mit einem Mercaptan, dem Thiophenol, umgesetzt.

Im Fall einer N-3 Chlorierung wurde in Betracht gezogen, durch reversiblen Schutz des Stickstoffs mit aus der Peptidchemie bekannten Schutzgruppen die radikalische Substitution an C-4 zu dirigieren, wodurch in einigen Fällen bei einfachen Lactamen die Bildung von α-Chloramiden ermöglicht wurde (33). Die Struktur von Cyclophosphamid ließ allerdings vermuten, daß nur eine beschränkte Anzahl von Amino/Imino-Schutzgruppen in Frage kommen würde.

Da derartige Cyclophosphamid-Derivate praktisch noch nicht synthetisiert wurden, war es auch, unabhängig von ihrem Reaktionsverhalten gegenüber einer Halogenierung, interessant, diese Verbindungen im Vergleich zu Cyclophosphamid mit freier NH-Gruppe in einem biologischen Test auf cancerostatische Wirksamkeit zu prüfen, zumal dem N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphorsäurediamid als ultimat wirksamen cancerostatischen Agens eine besondere Bedeutung zukommt.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

Es wurden bezogen: von der Firma

Merck, Darmstadt

- Kieselgel 60 F_{254}, Korngröße 0,063-0,2 mm, geeignet für die Trockensäulenchromatographie
- Pyridin p.a., getrocknet
- 3-Aminopropanol-(1)
- Triethylamin zur Synthese
- tert. Butyloxycarbonyl-hydrazid zur Synthese
- Natriumborhydrid
- Natriumchlorid p.a.
- metallisches Natrium
- Natriumhydroxid p.a.
- Tween 80
- Magnesiumsulfat getrocknet
- Dibenzoylperoxid zur Synthese
- Natriumhydrogencarbonat p.a.

ega-chemie, Steinheim

- Bis(2-chlorethyl)amin Hydrochlorid
- 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin
- 2,4-Dimethoxybenzaldehyd

Riedel-de Haen, Seelze Hannover

- DC-Karten SIF
- Benzaldehyd, chem. rein

Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA

- Phosphoroxychlorid

Messer-Griesheim

- Chlor, 99,99%

Woelm, Eschwege

- Nylonschlauch, Wandstärke 0,04 mm, 39 und 50 mm flacher Durchmesser

Chemische Fabrik Budenheim, Budenheim

- Nylonschlauch, Wandstärke 0,04 mm, 80 mm flacher Durchmesser

Sämtliche "p.a."Lösungsmittel wurden von Merck bezogen.

2.2. Angewandte Analysenverfahren

- Schmelzpunktbestimmung

  Apparat nach Dr. Tottoli, Fa. Büchi, Flawil, Schweiz.
  Die Schmelzpunkte sind sämtlich unkorrigiert.

- Elementaranalyse

  Die C,H,N-Analysen wurden mit dem Elemental-Analyzer 240 B, Fa. Perkin Elmer, Oberlingen, erhalten; die Bestimmung von S und Cl erfolgte nach SCHÖNINGER (34).

- Kernresonanzspektrogramme

  Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden mit dem Multikerngerät Bruker HFX-90 (22,628 MHz), Fa. Bruker, Karlsruhe, nach der PFT-Technik erhalten. Es wurden ca. 200 mg Substanz in jeweils 1,5 ml des entsprechenden Lösungsmittels gelöst.
  Das ^{1}H-NMR-Spektrum wurde mit dem 20,115 MHz Gerät WP-80, ebenfalls Bruker, gemessen.

- IR-Spektrogramme

  IR-Spektrograph, Modell 21 der Fa. Perkin Elmer. Zur Aufnahme der Spektren wurden entweder 1,5 mg der zu messenden Substanz mit 300 mg KBr vermischt oder, im Fall von ölenden Verbindungen, das Öl als dünner Film auf einen NaCl-Preßling aufgetragen.

- Feld-Desorptions (FD)-Massenspektrogramme

  Die FD-Massenspektren wurden mit dem Gerät 311 A der Fa. Varian, Bremen, gemessen (Ionenquelltemperatur 60^{o}C); die Emitterheizströme sind in den einzelnen Spektren angegeben.

Die Spektreninterpretationen erfolgten nach (35,36).

- Dünnschichtchromatographie

  Sämtliche Chromatogramme wurden auf Kieselgelplatten durchgeführt. Die Laufmittelsysteme waren die folgenden:

  I Chloroform/Methylenchlorid/Ether = 2:1:2
  II Chloroform/EtOH = 9:1
  III EtOH/Isopropanol/25% Ammoniak/Wasser = 5:3:1:1
  IV Butanol-(1)/Essigsäure/Wasser = 4:2:1
  V EE

- Sprühreagenzien für die Dünnschichtchromatographie

Ninhydrin-Reagenz: für Amine und Aminosäuren (37)
0,3 g Ninhydrin werden in 100 ml Butanol-(1) und 3 ml Essigsäure gelöst. Die trockene DC-Platte wird mit dem Reagenz besprüht, entwickelt wird durch Erhitzen auf 110°C.

NBP-Reagenz: für alkylierende Verbindungen (29)
Lösung A: 2% NBP-Lösung in Aceton
Lösung B: 1 N NaOH-Lösung in Wasser
Zunächst wird die trockene DC-Platte mit Lösung A besprüht, sodann über der Bunsen-Flamme bis zur leichten Ankohlung erhitzt und schließlich mit Lösung B besprüht. Bei positiver Reaktion: intensive Blaufärbung.

2.3. Chlorierung (38)

Das Reaktionssystem besteht aus einem 100 ml Dreihalskolben, versehen mit Intensivkühler (abgeschlossen durch ein mit $CaCl_2$ gefülltes Trockenrohr); die Einleitung des Chlors geschieht unmittelbar aus der Chlor-Druckgasflasche über einen PVC-Schlauch, an dessen Ende eine Pasteurpipette, fixiert mittels quick-fit, in das Reaktionsgefäß eintaucht.

Zur Chlorierung werden 2,5 mMol Cyclophosphamid bzw. dessen N-3 geschützten Derivate in Chloroform p.a. gelöst. Dazu gibt man 0,75 ml (= 9,5 mMol) trokkenes Pyridin p.a. und eine Spatelspitze Dibenzoylperoxid als Radikalstarter. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluß auf 100°C erhitzt und das Chlor eingeleitet (jeweils nur soviel, daß das abdestillierende Chloroform farblos bleibt). Nach jeder Chloreinleitung wird vom Reaktionsgemisch eine DC in Laufmittel V durchgeführt. Die Detektion der Substanzflecke erfolgt mit dem NBP-Test und durch Fluoreszenzabsorption bei 254 nm.

2.4. Umsetzung mit Thiophenol

Thiophenol war Modellsubstanz für die beabsichtigte Darstellung der 4-(S-R)-Mercapto-Derivate von Cyclophosphamid bzw. seiner N-3 Derivate. Thiophenolderivatisierte Verbindungen zeigen eine gute Fluoreszenzabsorption bei 254 nm und konnen so leicht uber Trockensäulenchromatographie (s. Abschnitt 2.5) gereinigt werden.

Ein weiterer Grund für die Wahl von Thiophenol besteht darin, daß aufgrund seiner Größe zu erwarten ist, daß 4-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid nur langsam zu 4-Hydroxycyclophosphamid bzw. Aldophosphamid hydrolysiert wird (vgl.

dazu auch Abschnitt 1.).

Um auch mittels DC nicht detektierbare α-Chloramide von Cyclophosphamid resp. seiner N-3 Derivate erfassen zu können, wird das Thiophenol unmittelbar dem Chlorierungsgemisch (s. Abschnitt 2.3.) zugesetzt. Dazu werden nach jeder Chloreinleitung 1 ml Reaktionsmischung entnommen und 0,05 ml einer Lösung von 1 ml Thiophenol in 1 ml Chloroform zupipettiert. Nach kurzem Umschütteln wird eine DC in Laufmittel V durchgeführt. Die Detektion erfolgt mit dem NBP-Test und durch Fluoreszenzabsorption.

2.5. Trockensäulenchromatographie (39,40)

Zur Herstellung der Trennsäule wird ein Nylonschlauch von 1 m Länge, dessen Ende mit Hilfe eines Hefters verschlossen wird, verwendet. Dieser wird mit der 300-fachen Gewichtsmenge, bezogen auf die zu trennende Substanzmenge, Kieselgel durch mehrmaliges festes Aufstoßen des Säulenendes gefüllt. Die in einem Lösungsmittel gelöste, konzentrierte Substanzmischung wird mit der 10-fachen Gewichtsmenge Kieselgel vermischt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Die erhaltene Mischung bringt man nun als Schicht auf den Kopf der Säule und füllt danach mit weiteren 2 cm Kieselgel auf. Abschließend wird die Säule mit Glaswolle verschlossen und das untere Ende mit einer Nadel durchstochen. Das Lösungsmittelgemisch, welches in der DC die besten Trennergebnisse geliefert hat, wird mit Hilfe eines Tropftrichters so auf die Säule gegeben, daß sich immer ca. 2 cm Lösungsmittel oberhalb der Glaswolle befindet.

Die Chromatographie ist beendet, wenn die Lösungsmittelfront das untere Ende erreicht hat. Die Säule wird dann unter einer UV-Lampe bei 254 nm betrachtet (wenn die Substanz Fluoreszenzabsorption zeigt), die zu erkennenden Zonen eingezeichnet und mit einer Rasierklinge herausgeschnitten.

Die Substanzen werden mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert (bei genügender thermischer Stabilität mit dem Soxhlet, ansonsten durch mehrmalige Lösungsmittelzugabe) und die erhaltenen Lösungen am Rotationsverdampfer eingeengt und mittels DC überprüft.

Sollte die in Betracht kommende Substanz keine Absorption zeigen, wird entsprechend dem in der DC ermittelten R_f-Wert die Säule im betreffenden Bereich fraktioniert, indem man ca. 5 cm lange Säulenabschnitte herausschneidet und nach Extraktion mittels DC überprüft.

Je nach zu trennender Substanzmenge werden Nylonschläuche unterschiedlicher Radien benutzt. Den erforderlichen Radius ermittelt man mit folgenden Daten:

- günstigste Trennlänge: 90 cm
- Substanz-Adsorptionsmittel-Verhältnis: 1:300
- 1000 ml Kieselgel entsprechen ca. 500 g.

Für die Trennung von 1 g Substanzmischung an Kieselgel werden somit 300 g bzw. 600 ml Adsorptionsmittel benötigt. Es wird ein 50 mm Schlauch verwendet. Da teilweise lediglich ein Schlauch mit 38 mm flachem Durchmesser zur Verfügung stand, erhöhte sich zur Trennung von ca. 1 g Substanzmischung die Trennlänge auf 120 cm.

2.6. Tests auf cancerostatische Wirksamkeit in-vivo

Die Versuche wurden in den Monaten Nov./Dez. 82 durchgeführt (zur saisonalen Abhängigkeit der akuten Toxizität siehe 41).

Als Versuchstiere dienten weibliche Reinzuchtmäuse des Stammes NMRI, die von der Süddeutschen Tierzuchtfarm, Tuttlingen, bezogen wurden. Die Mäuse wurden in Gruppen von 5 Tieren in Makrolon-Käfigen von 400 cm^2 Bodenfläche gehalten. Im Tierstall herrschten 23-25°C Raumtemperatur und ca. 60% rel. Luftfeuchtigkeit, der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden. Als Standarddiät erhielten die Tiere Altromin^R (Fa. Altrogge, Lage) und Leitungswasser ad libitum.

Für die Versuche wurden am Tag 0 einer ca. 1 Woche zuvor mit Ehrlich-Ascites-Tumor-Carcinom (EATC) geimpften Spendermaus unter Ethernarkose Ascitesflüssigkeit aus der Bauchhöhle abpunktiert und jeder Maus einer Gruppe von 5 Tieren (Mausgewicht ca. 30 g) 0,4 ml (= 10^5 Zellen) in die Bauchhöhle injiziert.

Behandlungsschema I

Am Tag 3 erhielten die Testgruppen eine Einzeldosis, gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel und einer Dosis, die 100 mg/kg Cyclophosphamid äquivalent sind, i.p. appliziert (Ausnahme: Dosis von 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino[2,1-b]-tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-9-oxid = 500 mg/kg). Unbehandelte Kontrolltiere erhielten lediglich das Lösungsmittel. Als positive Kontrolle wurde einer Gruppe Cyclophosphamid injiziert.

Behandlungsschema II

3-Chlor-cyclophosphamid und Cyclophosphamid als positive Kontrolle wurden in unterschiedlichen Dosen geprüft, wobei die Gesamtdosis 106 bzw. 100 mg/kg

betrug. Dazu erhielten die Tiere pro Gruppe die Gesamtdosis verteilt auf 8, 4 oder 2 Tage, beginnend mit dem Tag 1, in einem geeigneten Lösungsmittel i.p. injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten lediglich Lösungsmittel bei entsprechendem Behandlungsschema.

Details der Versuchsdurchführung siehe Abschnitt 5.1. und Tabellen I und II.

Die Tiere wurden jeden Tag kontrolliert und eventuelle Todesfälle protokolliert. Kriterium für die Wirksamkeit ist die mittlere Überlebenszeit. Dazu wird die Anzahl der Mäuse, die gleich lange überlebten, mit der entsprechenden Überlebenszeit in Tagen multipliziert, die Produkte addiert und durch die Anzahl der eingesetzten Tiere dividiert. Erhöhte Überlebenszeiten relativ zur Kontrollgruppe werden in % ausgedrückt (= ILS %).

3. SYNTHESEN

3.1. Untersuchungen zur Derivatisierung von Cyclophosphamid

3.1.1. Synthese der Ausgangsverbindungen

3.1.1.1. N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid (42)

50 g (= 0,28 Mol) Bis(2-chlorethyl)amin Hydrochlorid werden in 150 ml Dioxan suspendiert. Bei $0^{o}C$ werden unter starkem Rühren 28 ml (= 0,3 Mol) Phosphoroxychlorid und 47,5 ml (= 0,6 Mol) Pyridin zugegeben.

Die Suspension wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt, das gebildete Pyridin Hydrochlorid durch Vakuumfiltration entfernt und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird mit Hilfe einer Vakuumdestillation (105-115^{o}C, 0,4 mmHg) gereinigt und erstarrt bei Raumtemperatur. Zur weiteren Reinigung wird das Produkt bei Raumtemperatur in Aceton gelöst und nach Zugabe von Impfkristallen sukzessive auf ca. -20^{o}C abgekühlt, wonach das Produkt relativ sauber kristallisiert.

MG: 258,9
Ausbeute: 65 g (= 90% d.Th.)

Analytik

Fp.: 53-54^{o}C (Lit.: 54-56^{o}C)
Elementaranalyse:
ber.: C = 18,56 H = 3,12 N = 5,41 Cl = 54,77
gef.: C = 18,95 H = 3,29 N = 5,47 Cl = 54,92

Anmerkungen

Zur Synthese wurde das in der Literatur (42) angegebene Verfahren dahingehend variiert, daß Pyridin als HCl-Fänger verwendet und bei Raumtemperatur gearbeitet wurde. Die Ausbeute kann so beträchtlich gesteigert werden. Die Umkristallisation erfolgte immer unmittelbar vor der weiteren Verwendung, da das Produkt relativ instabil ist (Geruch!).

3.1.1.2. Cyclophosphamid x H_2O (43)

17,1 g (= 66 mMol) N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid werden in 250 ml EE gelöst. Die Lösung wird auf ca. $0^{o}C$ abgekühlt und nacheinander werden unter Rühren 5 ml (= 66 mMol) 3-Aminopropanol-(1) und 18,4 ml (= 132 mMol) TEA zugegeben.

Danach wird die Mischung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und das ausgefallene TEA Hydrochlorid durch Vakuumfiltration entfernt.

Zur weiteren Reinigung wird die EE-Lösung 3x mit je 200 ml Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt.

Zur Kristallisation werden zur eingeengten Lösung 1-2 ml Wasser zugegeben, weiter eingeengt und das zurückbleibende Öl in PE suspendiert. Es wird soviel EtOH zugegeben, bis sich alles gelöst hat, mit Impfkristallen angeimpft und langsam bis auf ca. -70°C abgekühlt. Nach einigen Tagen werden die gebildeten Kristalle abgesaugt, die Mutterlauge erneut eingeengt und wieder entsprechend mit PE und EtOH behandelt.

MG: 279,10
Ausbeute: 20,2 g (= 55% d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel I = 0,02, in Laufmittel II = 0,58
2. Fp.: 47-48°C (Lit.: 41-45°C)
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 30,12 H = 6,15 N = 10,04 Cl = 25,40
   gef.: C = 29,98 H = 6,08 N = 9,98 Cl = 25,46
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 2)
   3220 (breit, N-H st); 2960, 2880 (C-H st); 1450, 1430 (CH_2 def); 1230 (P=O st); 1125, 1090 (P-N-C st); 1045 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 3)
   25,64 (C-5, J_{cp} 5,72, Triplett); 41,20 (C-4, J_{cp} 2,29, Triplett); 42,10 (C-8, Triplett); 48,64 (C-7, J_{cp} 4,58, Triplett); 67,62 (C-6, J_{cp} 6,86, Triplett).

Anmerkungen

Die von ARNOLD und BOURSEAUX (43) angegebene Vorschrift wurde durch die Zugabe von TEA zum Reaktionsgemisch optimiert; die Ausbeute an Rohprodukt ist zufriedenstellend.

Schwierigkeiten bereitete allerdings die Kristallisation. Es wurden verschiedene Verfahren angewandt, u.a. auch eine Prozedur, wonach das Rohprodukt in Essigsäurebutylester gelöst wird und nach Zugabe von Wasser und PE

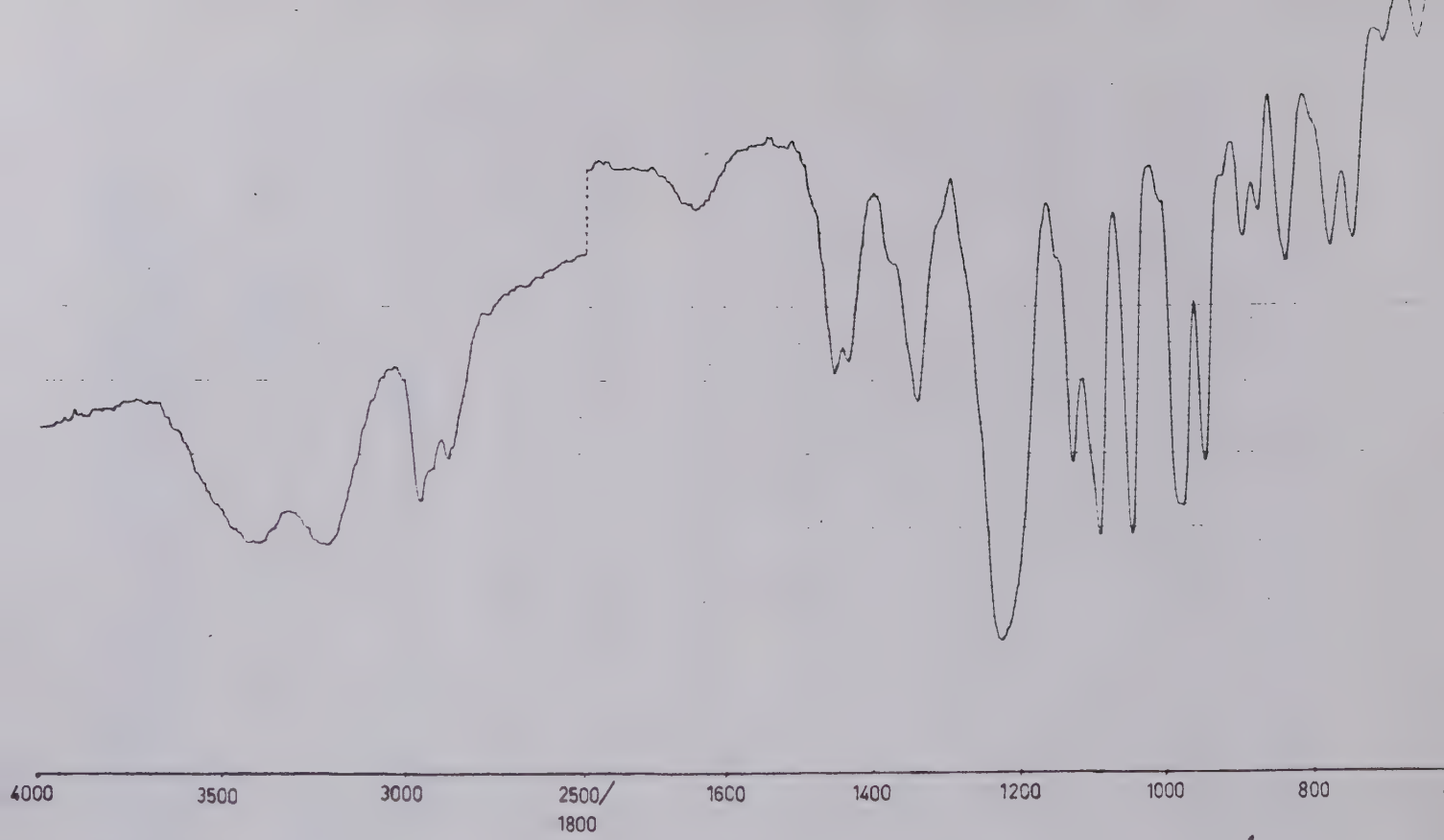
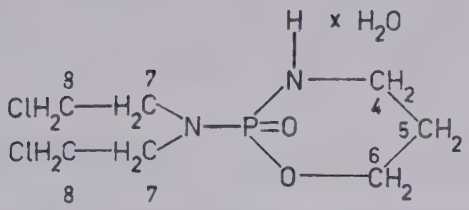


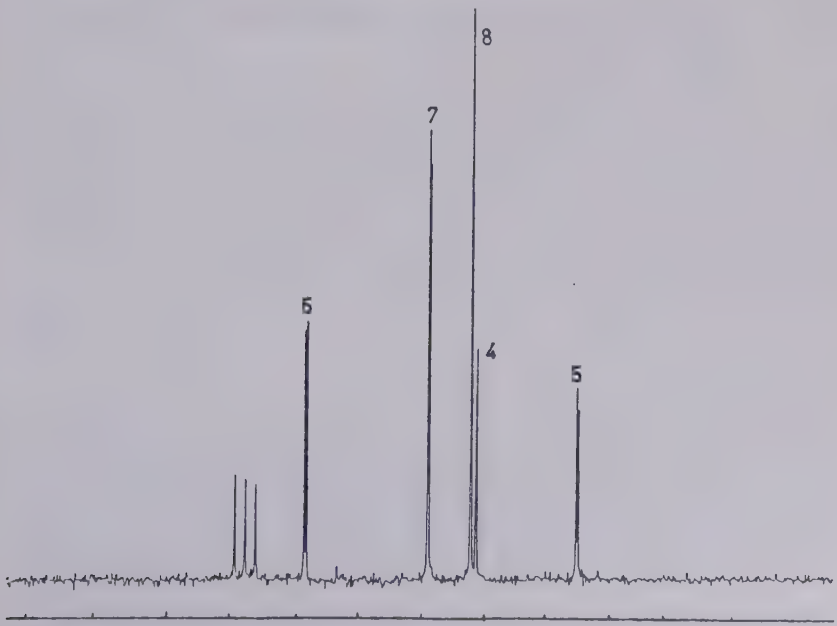
Abb. 2: IR-Spektrum von Cyclophosphamid x H_2O (KBr-disk)

bei -10°C kristallisiert; umkristallisiert wird aus EtOH/Wasser (44). Der letzte Reinigungsschritt kann durch das von mir angewandte Verfahren umgangen werden, ohne daß die ansonsten notwendige und problematische Trocknung des Hydrats erforderlich wäre (z.B. führt die Anwendung des Trocknungsmittels P_4O_{10} zur vollständigen Dehydratisierung (45)).

Zur Charakterisierung des Produkts wurden mehrere Analysenverfahren eingesetzt; insbesondere die chemischen Verschiebungen im ^{13}C-NMR-Spektrum dienten als Bezug für die Strukturaufklärung der noch nicht beschriebenen Cyclophosphamid-Derivate. Die erhaltenen Daten entsprechen denjenigen, die mit gekauftem Material (Fa. Paesel, Frankfurt) erhalten wurden.

Abb. 3: ^{13}C-NMR-Spektrum von Cyclophosphamid x H_2O
(^1H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)





3.1.2. Chlorierung von Cyclophosphamid

0,7 g (= 2,5 mMol) Cyclophosphamid x H_2O werden in 50 ml Chloroform gelöst, mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert, der Rückstand mit 10 ml Chloroform gewaschen und eine Chlorierung entsprechend Abschnitt 2.3. durchgeführt.

Schon bald ist eine NBP pos., UV pos. Substanz mit dem R_f-Wert von 0,28 (neben unverändertem Ausgangsmaterial) nachweisbar. Nach weiteren Chloreinleitungen verschwindet Cyclophosphamid vollständig.

Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es kaum zu Veränderungen, d.h. die Substanz mit dem R_f-Wert = 0,28 ist weitgehend die einzige, in nennenswertem Umfang auftretende Verbindung. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutliche Verminderung des Pyridin; es muß eine wie auch immer geartete Chlorierung unter Bildung von Pyridin Hydrochlorid stattgefunden haben.

Erst zu einem Zeitpunkt, wenn Pyridin nur noch in Spuren vorhanden ist, kommt es zu weitgehenden Änderungen im Sinne einer Abnahme der Verbindung mit dem R_f = 0,28 zugunsten der Bildung einer NBP pos., UV neg. Substanz, R_f = 0,39 neben mehreren, kaum detektierbaren Substanzflecken und Cyclophosphamid.

Dieses Bild ändert sich nicht mehr; es findet keine weitere Chloraufnahme statt.

3.1.2.1. Darstellung, Isolierung und Charakterisierung von 3-Chlorcyclophosphamid

2,79 g (= 10 mMol) Cyclophosphamid x H_2O werden in 80 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wird mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und der Rückstand mit 20 ml Chloroform gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml (= 38 mMol) Pyridin und einer Spatelspitze Dibenzoylperoxid wird auf dem Ölbad auf 100°C erhitzt und portionsweise Chlor eingeleitet. Die Beendigung der Reaktion wird durch das vollständige Verschwinden von Cyclophosphamid in der DC angezeigt.

Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt, in 50 ml EE suspendiert, das ausgefallene Pyridin Hydrochlorid abgesaugt und der Rückstand mit 20 ml eiskaltem EE gewaschen.

Um zu einem kristallisierbaren Produkt zu gelangen, wird die EE-Lösung auf ca. 30 ml eingeengt und mit Hilfe der Trockensäulenchromatographie (vgl. Abschnitt 2.5.) gereinigt. Dazu werden 10 g Kieselgel mit 10 ml der Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und auf eine vorberei-

tete Kieselgelsäule gegeben (Daten der Säule: Trennlänge 90 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm, flacher Durchmesser 50 mm). Entwickelt wird mit ca. 350 ml des DC-Laufmittels V. Die Detektion der Lage der Substanzbande wird unter UV bei 254 nm vorgenommen, der entsprechende Abschnitt aus der Säule herausgeschnitten und mit Chloroform extrahiert (3x mit je 200 ml). Die vereinigten Extrakte werden am Rotationsverdampfer eingeengt und das zurückbleibende Öl stellt man für mehrere Tage bei -20°C in das Gefrierfach, worauf sich das 3-Chlor-cyclophosphamid kristallin abscheidet.

Die restliche EE-Lösung wird von Pyridin Hydrochlorid durch Ausschütteln mit Wasser befreit; es genügt in der Regel 2-maliges Ausschütteln mit je 100 ml Wasser; die vollständige Entfernung wird mit Hilfe von Silbernitrat überprüft. Die Lösung wird anschließend über $MgSO_4$ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und dem zurückbleibenden Öl Impfkristalle zugesetzt. Nach ca. 1-2 Tagen bei -20°C im Gefrierfach ist es vollständig durchkristallisiert; auf Umkristallisieren kann verzichtet werden.

MG: 295,52
Ausbeute: 2,3 g (= 78% d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel I = 0,21, in Laufmittel V = 0,28
2. Fp.: 51-53°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 28,58 H = 4,81 N = 9,53 Cl = 36,16
   gef.: C = 28,79 H = 4,92 N = 9,55 Cl = 35,75
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 4)
   2960, 2920, 2880 (C-H st); 1470, 1450 (CH_2 def); 1245 (P=O st); 1130, 1105 (P-N-C st); 1050 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 5)
   28,58 (C-5, Triplett); 41,78 (C-8, Triplett); 49,37 (C-7, J_{cp} 3,43, Triplett); 56,92 (C-4, Triplett); 67,53 (C-6, J_{cp} 5,72, Triplett).

Anmerkungen

Die Darstellung von 3-Chlor-cyclophosphamid erfolgte weitgehend problemlos, da aufgrund des unter Abschnitt 3.1.2. beschriebenen Reaktionsablaufs zunächst diese Substanz auch nach mehrmaliger Chloreinleitung praktisch das

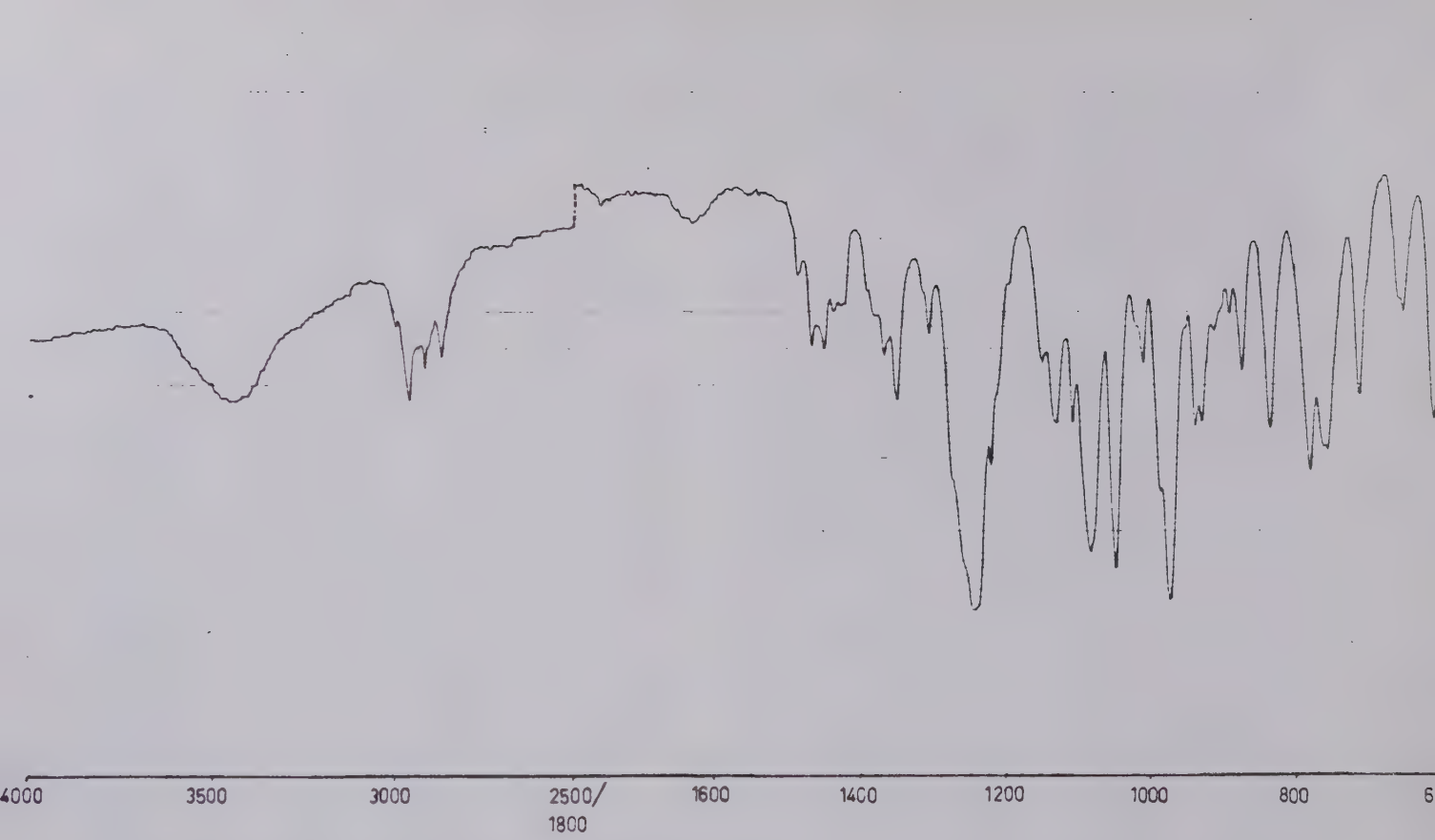


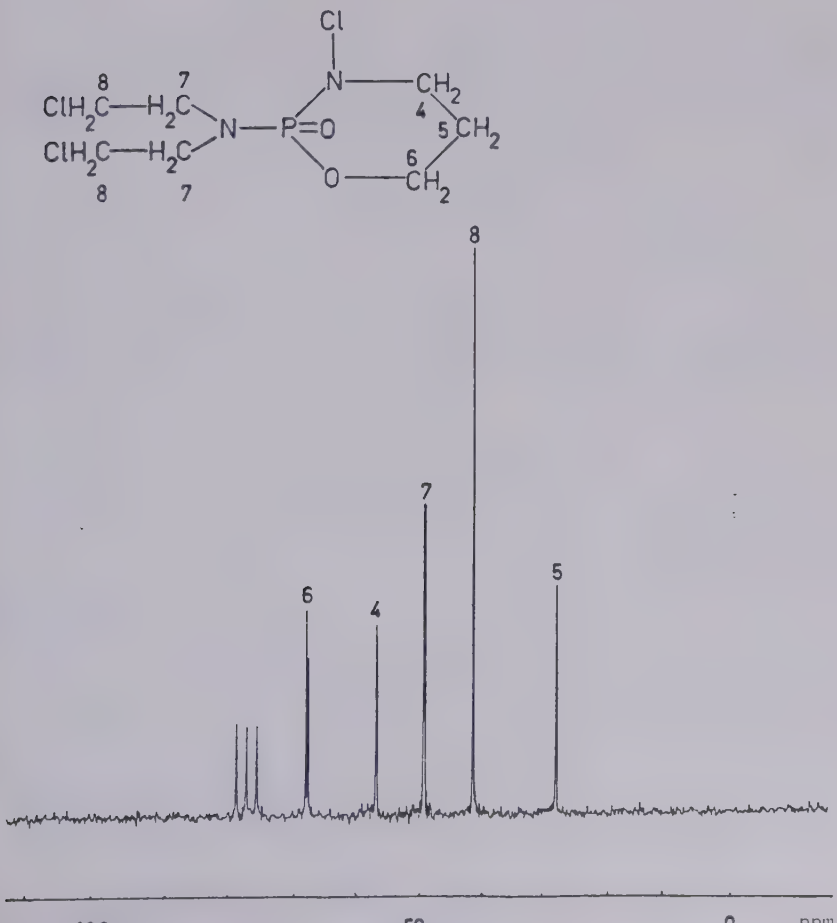
Abb. 4: IR-Spektrum von 3-Chlor-cyclophosphamid (KBr-disk)

einzige Reaktionsprodukt ist.
Obwohl die N-Cl Bindung labil ist (s.u.), war es doch möglich, das Pyridin Hydrochlorid quantitativ mit der beschriebenen Methode abzutrennen.

Mit Hilfe der Trockensäulenchromatographie, die sich als sehr geeignet zur Trennung derartiger lipophiler Stoffe erwiesen hat, war die Isolierung ohne Schwierigkeiten zu bewerkstelligen, zumal 3-Chlor-cyclophosphamid eine ausreichende Fluoreszenzabsorption zeigt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von ZON et al. (46), die 3-Chlor-cyclophosphamid auf anderem Weg dargestellt haben, konnte das isolierte Produkt kri-

Abb. 5: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-Chlor-cyclophosphamid
(^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



stallisiert werden. Es zeigte sich aber, daß Verbindungen, deren Festpunkt unterhalb von 60-70°C liegt, nur bedingt kristallisierbar sind, da schon geringfügige Verunreinigungen ein Schmelzen nach längerem Stehen bei Raumtemperatur zur Folge haben.

Die Kristalle sind über längere Zeit bei -20°C haltbar, ohne daß mit der DC eine Bildung von Cyclophosphamid nachweisbar wäre. In Lösung jedoch zeigt sich, daß, abhängig von dem Reduktionsvermögen des Lösungsmittels bzw. zugesetzter Reduktionsmittel (z.B. Thiophenol), eine mehr oder weniger schnelle Zersetzung stattfindet, deren Endprodukt Cyclophosphamid ist.

Die Identität von 3-Chlor-cyclophosphamid wurde durch ^{13}C-NMR und IR nachgewiesen.

- Die chemische Verschiebung von C-4 ist nicht so groß, wie man sie für eine C-Chlorierung erwarten sollte.
- Im off-reonance-Spektrum sind ausschließlich Tripletts vorhanden.
- Die im IR-Spektrum sichtbare breite Absorption bei 3440 cm^{-1} ist lediglich auf Wasser, welches im KBr als Verunreinigung vorliegt, zurückzuführen; eine N-H Valenzschwingung ist auszuschließen.

3.1.2.2. Untersuchungen zur Dehydrohalogenierung von 3-Chlor-cyclophosphamid

In der Literatur wird die Dehydrohalogenierung von am Stickstoff chlorierten Methylaminen als eine Nebenreaktion beschrieben, die in Gegenwart von Basen stattfindet (47,48). In Analogie dazu würde eine solche Eliminierungsreaktion bei 3-Chlor-cyclophosphamid zu 3,4-Dehydrocyclophosphamid führen, einer Verbindung, die auch in der Literatur zu Cyclophosphamid als ein Zwischenprodukt in der Metabolisierung von Cyclophosphamid erwähnt wird. Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Beteiligung von 3-Hydroxycyclophosphamid an der Aktivierung von Cyclophosphamid wird eine Dehydratisierung mit anschließender Wasseranlagerung diskuttiert (49).

Es wurde daher versucht, Bedingungen zu finden, die eine Dehydrohalogenierung zu 3,4-Dehydrocyclophosphamid ermöglichen. Auch dieses Produkt könnte durch Addition von Mercaptanen zu den gewünschten 4-(S-R)-Mercapto-Derivaten führen.

3.1.2.2.1. Untersuchungen mit Natriumhydroxid

Es werden 50 mg (= 1,25 mMol) Natriumhydroxid zu einer Lösung von 0,3 g (= 1 mMol) 3-Chlor-cyclophosphamid in 2 ml Ether gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Verlauf der Reaktion wird mittels DC, Laufmittel II, dokumentiert, Detektion erfolgt mit NBP und UV.

Es zeigt sich, daß bereits nach 1 h neben unverändertem 3-Chlor-cyclophosphamid ein deutlicher Anteil an Cyclophosphamid entstanden ist. Direkt über Cyclophosphamid befindet sich zu diesem Zeitpunkt ein etwas schwächer imponierender Substanzfleck, ansonsten sind keine Reaktionsprodukte sichtbar. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens kann angenommen werden, daß es sich hierbei um dieselbe Substanz handelt, die auch bei der Behandlung von Cyclophosphamid mit metallischem Natrium entsteht (s. Abschnitt 3.5.4.).

Nach einer weiteren Stunde ist diese Substanz weitgehend verschwunden, der Cyclophosphamid-Anteil hat sich vergrößert, oberhalb von 3-Chlor-cyclophosphamid, welches nach wie vor die Hauptmenge innerhalb des Reaktionsgemischs darstellt, ist ein schwach NBP pos. Fleck sichtbar.

Dieses Bild ist in seiner Tendenz nach 4 h bzw. 12 h lediglich verstärkt, d.h. relative Abnahme von 3-Chlor-cyclophosphamid, relative Zunahme von Cyclophosphamid, oberhalb von 3-Chlor-cyclophosphamid oben erwähnter Substanzfleck, geringfügige hydrophile Anteile.

Ergebnis: Keinerlei isolierbare Substanz entstanden, da chromatographische Auftrennung aufgrund ähnlicher Laufeigenschaften unter diesen Bedingungen nicht möglich.

3.1.2.2.2. Untersuchungen mit Natriummethylat

Man löst 290 mg (= 12,5 mTom) metallisches Natrium in 10 ml MeOH, entnimmt 1 ml der Lösung, engt am Rotationsverdampfer bis zur Trockene ein, nimmt in 1 ml Ether auf und gibt dazu eine Lösung von 0,3 g (= 1 mMol) 3-Chlor-cyclophosphamid in 1 ml Ether.

Schon bei Zugabe der 3-Chlor-cyclophosphamid-Lösung kommt es zu einer heftigen Reaktion, sodaß nach 1 h nur noch ein Schatten von 3-Chlor-cyclophosphamid sichtbar ist. Cyclophosphamid ist vorhanden, der größte Teil aber hat zu stark hydrophilen Substanzen reagiert, die fast alle in der Nähe des Auftragpunktes der DC liegen.

Nach 2 h, 4 h bzw. 12 h hat sich dieses Bild nicht wesentlich geändert.

Ergebnis: Irgendeine isolierbare Substanz ist nicht sichtbar.

3.1.2.2.3. Untersuchungen mit Pyridin

Zu einer Lösung von 0,3 g (= 1 mMol) 3-Chlor-cyclophosphamid in 2 ml Ether gibt man 0,1 ml (= 1,25 mMol) Pyridin. Inkubation und Verlaufskontrolle wie unter 3.1.2.2.1..

Nach 1 h zeigt sich auch hier ein deutlicher Anteil von Cyclophosphamid, der im Verlauf der folgenden Zeit (2 h, 4 h bzw. 12 h) zuungunsten von 3-Chlor-cyclophosphamid stärker wird, ansonsten keine zusätzlichen Produkte detektierbar.

Ergebnis: Keinerlei isolierbare Substanz vorhanden.

3.1.2.2.4. Untersuchungen mit Natriumamid

Man destilliert in eine Kühlfalle Ammoniak und gibt 5 ml des flüssigen Ammoniak zu ca. 150 mg (= 6,5 mTom) metallischem Natrium. Die blaue Lösung wird vorsichtig unter Wasserausschluß eingedampft, der Rückstand in 5 ml Ether aufgenommen und dazu eine Lösung von 1,5 g (= 5 mMol) 3-Chlor-cyclophosphamid in 5 ml Ether gegeben. Inkubation und Verlaufskontrolle wie unter 3.1.2.2.1. beschrieben.

Der Reaktionsverlauf gleicht in etwa demjenigen der Reaktion 3.1.2.2.3., d.h. schon nach 1 h ist praktisch kein 3-Chlor-cyclophosphamid mehr vorhanden, Cyclophosphamid und hydrophile Anteile, die diffus über eine große Laufstrecke verteilt sind, bestimmen das Bild. Auch hier ändert sich das Bild im Lauf der Reaktionszeit nur unwesentlich.

Ergebnis: Keine isolierbare Substanz vorhanden.

3.1.2.3. Darstellung und Isolierung eines weiteren Chlorierungsprodukts

In das Reaktionsgemisch des Abschnitts 3.1.2. wird soviel Chlor eingeleitet, wie zur Darstellung der Substanz mit dem R_f-Wert von 0,39 notwendig ist.

Es wird am Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand in 50 ml EE aufgenommen und das ausfallende Pyridin Hydrochlorid durch Vakuumfiltration entfernt. Die EE-Lösung wird auf ein Volumen von 10 ml eingeengt und einer Trockensaulenchromatographie entsprechend Abschnitt 2.5. unterworfen. Säulendaten: Trennlänge 90 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm und einem flachen Durchmesser von 50 mm, Elutionsmittel: Laufmittel V.

Da eine Detektion der gesuchten Substanzbande mit UV nicht möglich ist, wird

die Säule nach der Entwicklung fraktioniert. Dazu berechnet man mit Hilfe des R_f-Wertes der DC von 0,39 die Säulenlänge, die der Mitte der Substanzbande entspricht und schneidet unterhalb und oberhalb mehrere etwa 5 cm lange Stücke heraus. Die Extraktion der Kieselgelfraktionen erfolgt mit EE (jeweils 2x mit je 150 ml). Diejenigen Fraktionen, die nur die gesuchte Substanz enthalten, werden gepoolt und am Rotationsverdampfer bis zur Trokkene eingeengt.

Ausbeute: 120 ml öliges Produkt

Anmerkungen

Das erst sehr viel später auftretende zweite Chlorierungsprodukt war zwar leicht zu isolieren, eine Charakterisierung war jedoch unmöglich. Das erhaltene Öl ließ sich auch nach Anwendung verschiedener Kristallisationstechniken nicht kristallisieren.

Ein ^{13}C-NMR-Spektrum zeigte, daß es sich um ein an verschiedenen Stellen substituiertes Cyclophosphamid-Dimeres handeln sollte. Eine Zuordnung der Signale war nicht möglich, da trotz chromatographischer Einheitlichkeit in den Laufmitteln I und V nicht abzutrennende Verunreinigungen vorlagen, deren Signale dem Hauptanteil vergleichbare chemische Verschiebungen und relativ hohe Intensitäten aufwiesen.

3.1.3. Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.1.2. mit Thiophenol

Der Reaktionsansatz entspricht demjenigen des Abschnitts 3.1.2..
Die Umsetzung mit Thiophenol entspricht Abschnitt 2.4..

Sobald aufgrund der Chloreinleitung das gesamte Cyclophosphamid zu 3-Chlorcyclophosphamid reagiert hat, zeigt sich neben dem dominierenden Cyclophosphamid (Reduktionsprodukt der Reaktion von 3-Chlor-cyclophosphamid mit Thiophenol) ein schwach NBP pos. Substanzfleck mit R_f= 0,34, der im Verlauf der weiteren Reaktion etwas an Intensität gewinnt. Wie aus Vergleichen mit dem auf anderem Wege dargestellten 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid (s. Abschnitt 3.4.1.4.) hervorgeht, verhalten sich beide Substanzen chromatographisch identisch, sodaß angenommen werden darf, daß es sich hier um dieselbe Substanz handelt. Zusätzlich wird nach weiterer Einleitung von Chlor eine Substanz mit dem R_f-Wert von 0,19 (NBP und UV pos.) gebildet, die späterhin sogar die NBP-Intensität von Cyclophosphamid übertrifft, welches zu diesem Zeitpunkt in nur geringem Maße vorhanden ist.

Der Anteil dieser unbekannten Verbindung läßt sich aber nicht weiter steigern. In dem Maße, wie der Anteil des 2. Chlorierungsprodukts im chlorierten Gemisch zunimmt (s. Abschnitt 3.1.2.), kommt es zu einer Veränderung, die darin kumuliert, daß eine Reaktion des Thiophenol nicht mehr nachweisbar ist und die DC das gleiche Erscheinungsbild aufweist wie die DC des Chlorierungsgemischs.

Es war jedoch möglich, die Reaktion so zu steuern, daß die Substanz mit dem R_f = 0,19 isoliert und charakterisiert werden konnte.

3.1.3.1. Darstellung, Isolierung und Charakterisierung von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid

Der Reaktionsansatz entspricht Abschnitt 3.1.3..

Es wird soviel Chlor eingeleitet, bis die Umsetzung mit Thiophenol einen relativ hohen Anteil der zu isolierenden Substanz mit dem R_f-Wert von 0,19 anzeigt. Nun gibt man unter Umschütteln 1,5 ml der Thiophenol-in-Chloroform-Lösung zum gesamten Reaktionsansatz, engt am Rotationsverdampfer ein, fügt 50 ml EE hinzu und filtriert vom ausgefallenen Pyridin Hydrochlorid ab. Die EE-Lösung wird bis auf 10 ml eingeengt, 10 g Kieselgel zugegeben, bis zur Trockene eingedampft und einer Trockensäulenchromatographie entsprechend Abschnitt 2.5. unterworfen. Säulendaten: Trennlänge 90 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm und einem flachen Durchmesser von 50 mm, Elutionsmittel: Laufmittel V, ca. 350 ml.

Die Detektion der Substanzbande ist grob durch UV möglich, jedoch ist es vorzuziehen, die Säule im in Frage kommenden Bereich wie im Abschnitt 3.1.2.3. beschrieben zu fraktionieren, da sonst eine zu große Verunreinigung mit angrenzenden Stoffen auftreten kann. Die Extraktion erfolgt mit EE (jede Fraktion mit insgesamt 300 ml). Diejenigen Fraktionen, die ausschließlich 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid enthalten, werden gepoolt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird teilweise schon zu diesem Zeitpunkt fest; eine Analyse des so erhaltenen Produkts zeigt zwar dünnschichtchromatographische Einheitlichkeit, die Elementaranalyse ist jedoch nicht zufriedenstellend.

Daher wurde das festgewordene Öl dem folgenden Verfahren unterworfen: man löst es in einem gerade ausreichenden Volumen EE bei Raumtemperatur und destilliert das Lösungsmittel durch vorsichtige und mehrmalige Evakuierung bei ca. 4°C weitgehend ab. Wenn die Kristallbildung eingesetzt hat,

wird der Vorgang bei ca. -20°C zum Abschluß gebracht. Danach pipettiert man die überstehende Flüssigkeit ab und trocknet die Kristalle im Exsikkator über Paraffin bei ca. 4°C.

MG: 397,33
Ausbeute: 60 mg

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,19
2. Fp.: 103°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 45,34 H = 5,85 N = 7,05 S = 8,07 Cl = 17,84
   gef.: C = 45,42 H = 5,88 N = 7,03 S = 8,32 Cl = 18,23
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 6)
   3020 (aromat. C-H st); 3000, 2960, 2940, 2900, 2880 (C-H st); 1460, 1440 (CH_2 def); 1230 (P=O st); 1130, 1095 (P-N-C st); 1050 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 7)
   19,59 (C-10, Quadruplett); 26,36 (C-5, Triplett); 39,28 (C-9, Triplett); 42,12 (C-8, Triplett); 48,38 (C-7, Triplett); 63,97 (C-4, Dublett); 67,64 (C-6, J_{cp} 5,72, Triplett); 129,06 (C-4´, Dublett); 129,17 (C-2´/C-6´, Dublett); 133,21 (C-1´, Singlett); 135,54 (C-3´/C-5´, Dublett).
6. FD-Massenspektrogramm-Daten in m/e, 0-25 mA ehc (Abb. 8)
   396 = $M^{+\cdot}$; 287 = $M^{+\cdot}$ - 109 ($S\text{-}C_6H_5^+$); 109 = $S\text{-}C_6H_5^+$.

Anmerkungen

Der Verlauf der unter 3.1.3. beschriebenen Umsetzung des Chlorierungsgemischs mit Thiophenol deutete bereits an, daß eine Darstellung des gewünschten Produkts sehr schwierig sein würde. Es kann z.B. beobachtet werden, daß die DC zunächst ein gutes Ergebnis zeigt, bei anschließender Umsetzung des Chlorierungsgemischs als ganzes mit Thiophenol jedoch nur ein geringerer Umsatz stattgefunden hat; die oben angegebene Ausbeute ist also lediglich eine maximal erreichbare.

Die Isolierung der Substanz gestaltete sich, vorausgesetzt, die Absorptionsintensität im Fluoreszenz-Test war groß genug, nicht so schwierig. Es war jedoch nicht möglich, die gesamte auf die Säule aufgetragene Substanzmenge chromatographisch rein zu erhalten, sodaß eine Rechromatographie der noch

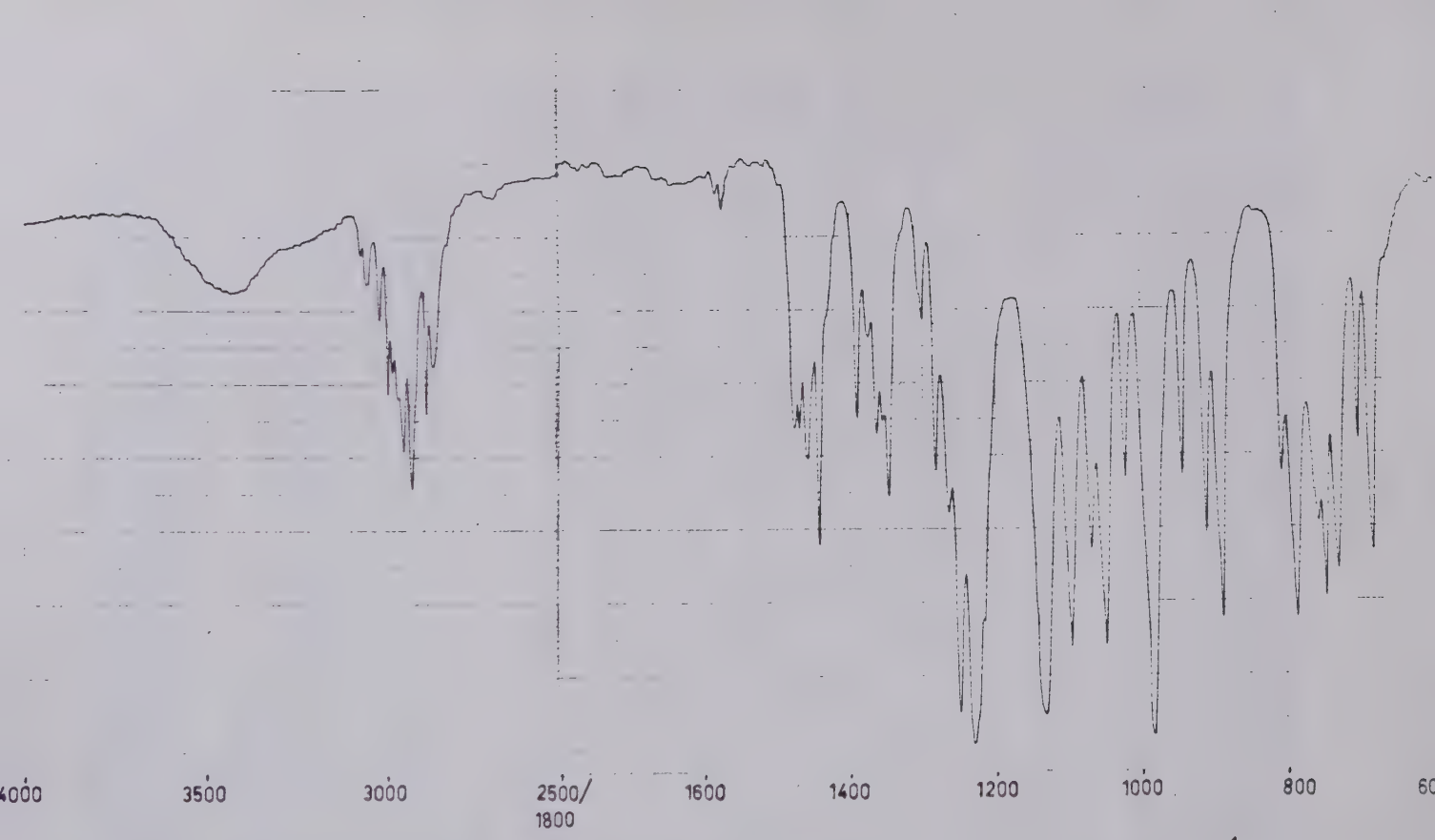
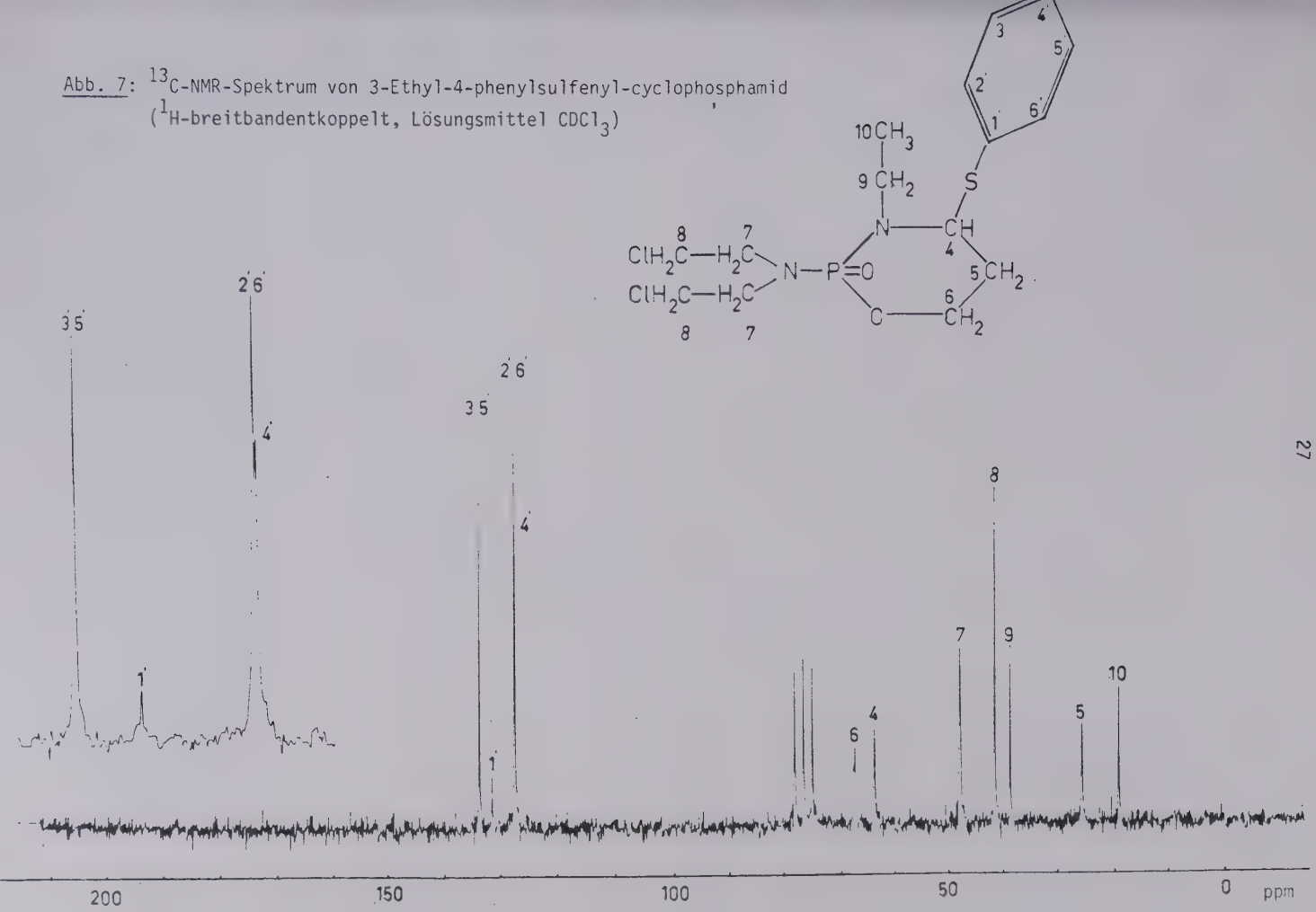


Abb. 6: IR-Spektrum von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid (KBr-disk)

Abb. 7: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



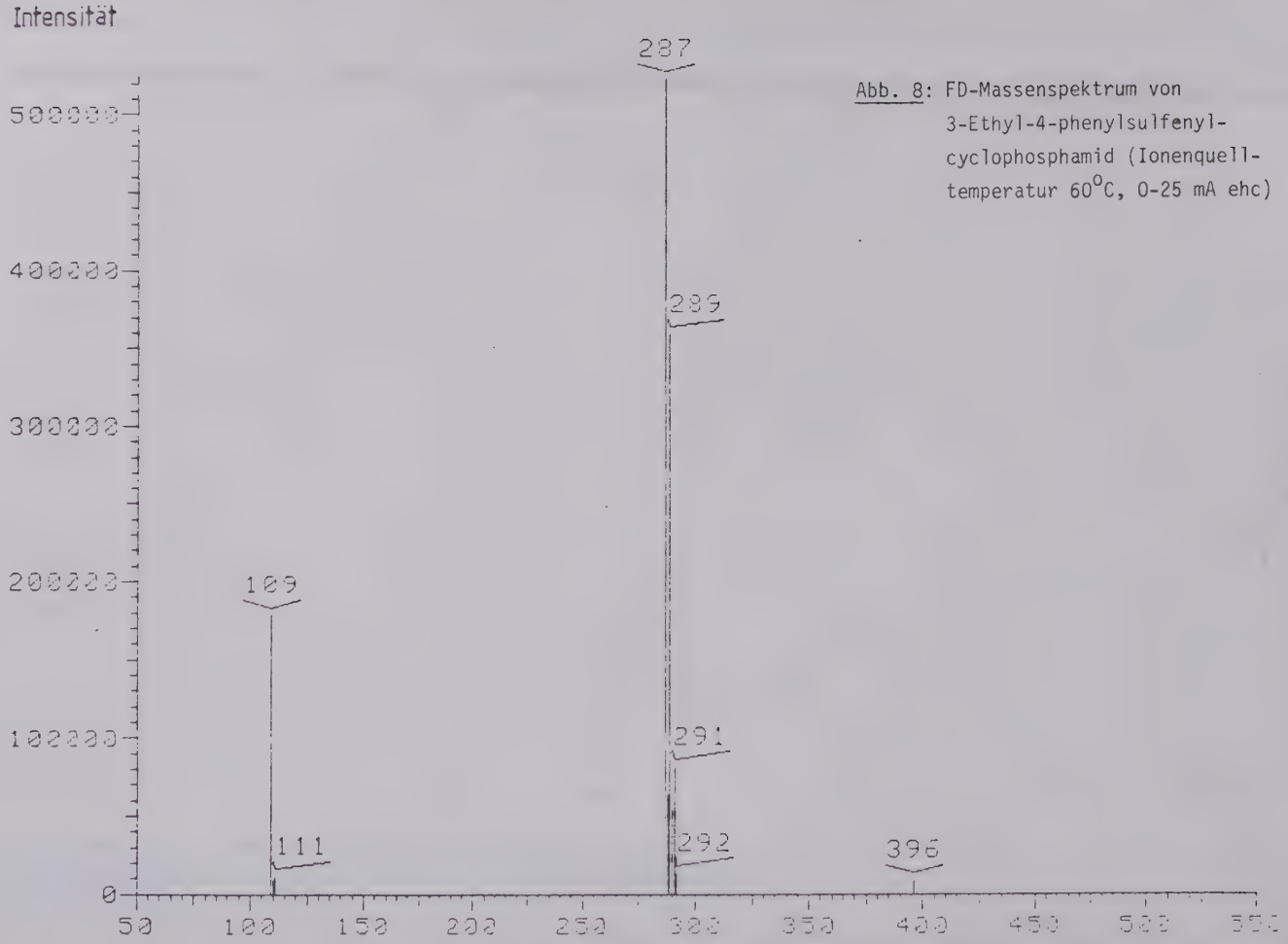


Abb. 8: FD-Massenspektrum von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid (Ionenquell-temperatur 60°C, 0-25 mA ehc)

verunreinigten Fraktionen notwendig wurde.

Die Kristallisation bereitete keine Probleme, jedoch war das so erhaltene Produkt nicht sauber genug. Das oben angegebene Verfahren zur Rekristallisation hat sich in diesem Fall bestens bewährt. Das getrocknete Präparat zeigte allerdings immer die Eigenschaft, in geringem Maß nach Mercaptan zu riechen; auch eine mehrfache Wiederholung der Reinigungsprozedur brachte keine besseren Ergebnisse, wie auch die Elementaranalyse zeigt.

Die anschließende Charakterisierung des Produkts konnte die Struktur 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid wahrscheinlich machen.

- Die chemischen Verschiebungen von C-5, C-6, C-7 und C-8 entsprechen in etwa denjenigen von Cyclophosphamid, es handelt sich jeweils um Tripletts.
- Das Signal bei 63,97 ppm, ein Dublett, deutet darauf hin, daß zwei elektronegative Substituenten gebunden sind; die Zuordnung zu C-4 des Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Gerüsts erscheint plausibel.
- Die Interpretation der bei 19,58 ppm (= $-CH_3$) bzw. 39,28 ppm (= $-CH_2-$) auftretenden Signale ist nur im Sinn der Struktur 3-Ethyl möglich, da auch das IR-Spektrum (keine N-H Valenzschwingung) dies wahrscheinlich macht.
- Das FD-Massenspektrum zeigt zwar den Molekularmassenpeak bei 396, dessen Intensität ist allerdings erheblich geringer als der bei 287. Auch diese Daten sind nur durch die postulierte Struktur erklärbar.

Die Konfiguration an C-4 wurde nicht überprüft, zumal auch das entsprechende Diastereomerenpaar nicht isoliert werden konnte.

3.2. Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-Benzyl-cyclophosphamid

3.2.1. Synthese der Ausgangsverbindungen

3.2.1.1. N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid

Darstellung siehe Abschnitt 3.1.1.1.

3.2.1.2. N-Benzyl-3-aminopropanol-(1) Hydrochlorid (50)

Zu 10,6 g (= 0,1 Mol) frisch destilliertem Benzaldehyd (Kp.: 53-55°C), gelöst in 50 ml MeOH, werden unter Eiskühlung 7,51 g (= 0,1 Mol) 3-Aminopropanol-(1) zugegeben und die Mischung für ca. 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Man gibt unter starkem Rühren und Eiskühlung portionsweise 1,14 g (= 0,03 Mol) $NaBH_4$ hinzu. Die Reduktion ist beendet, wenn keine Blasen mehr auftreten.

Das Produkt wird am Rotationsverdampfer eingeengt und in 200 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Die wasserlöslichen Anteile werden durch Extraktion mit Wasser (2x je 100 ml) entfernt, die organische Phase mit $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird in 250 ml EtOH gelöst.

Zur Bildung des Hydrochlorids werden 20 ml einer 5 N ethanolischen HCl-Lösung zugesetzt. Dabei ist auf eine ausreichende Kühlung und portionsweise Zugabe zu achten. Zur Kristallisation wird die Lösung erneut am Rotationsverdampfer eingeengt, in Ether aufgenommen, bis zur schwach sichtbaren Trübung mit EtOH versetzt und über Nacht im Gefrierfach belassen. Die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt, mit Ether gewaschen und durch mehrfaches Suspendieren in Ether weitgehend von anhaftendem Benzaldehyd befreit. Abschließend wird der Kristallbrei noch mit PE gewaschen und im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet.

MG: 201,72
Ausbeute: 11,1 g (= 55% d.Th.)

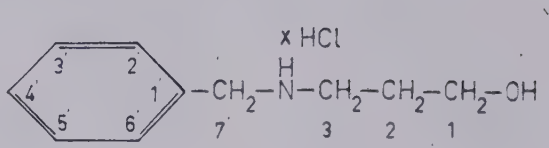
Analytik

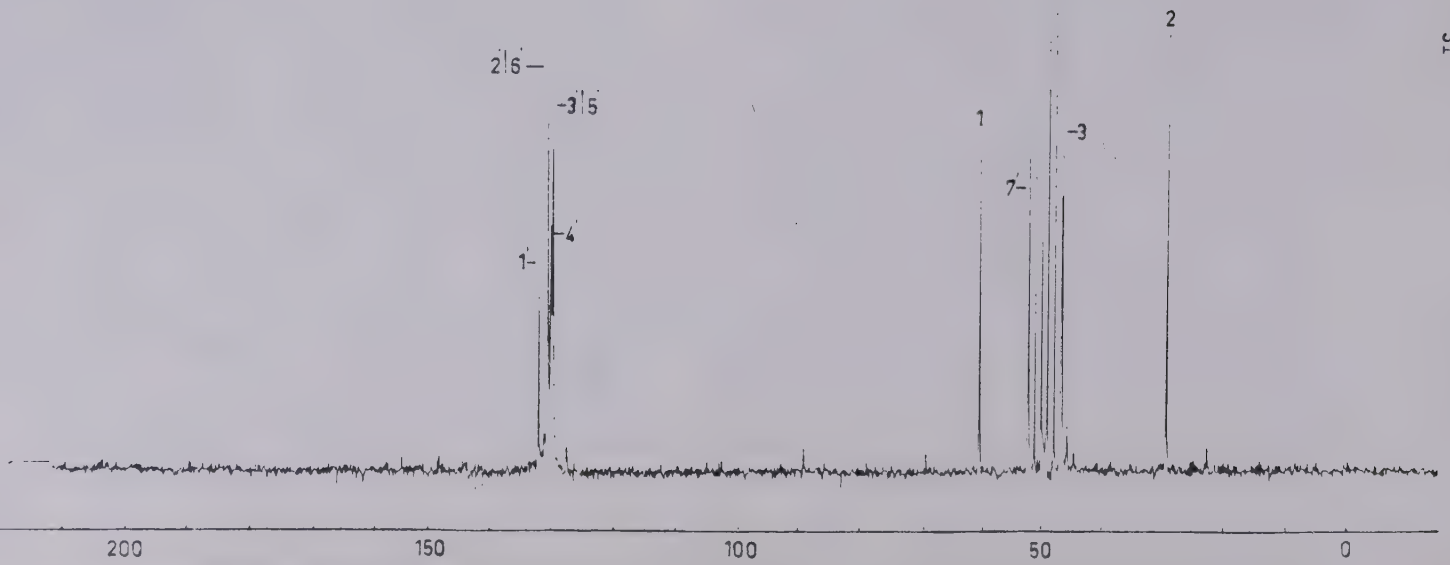
1. R_f-Wert in Laufmittel III = 0,61 (freie Base), 0,09 (Hydrochlorid);
   R_f-Wert in Laufmittel IV = 0,19 (freie Base), 0,05 (Hydrochlorid).
2. Fp.: 83-85°C (Lit. (51): 84-85°C)
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 59,54 H = 8,01 N = 6,95 Cl = 17,57
   gef.: C = 59,29 H = 8,19 N = 7,03 Cl = 17,69
4. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel CD_3OD (Abb. 9)
   29,49 (C-2, Triplett); 46,68 (C-3, Triplett); 52,19 (C-7, Triplett);
   60,27 (C-1, Triplett); 130,19 (C-3´/C-5´, Dublett); 130,53 (C-4´, Dublett);
   131,04 (C-2´/C-6´, Dublett); 132,52 (C-1´, Singlett).

Anmerkungen

Obwohl lediglich äquimolare Mengen von Benzaldehyd und 3-Aminopropanol-(1) zur Synthese eingesetzt wurden, war es trotz wiederholter Umkristallisation bzw. Suspendierung in Ether/PE nicht möglich, sämtliche Reste von Benzaldehyd zu entfernen (Geruch!). Dies zeigt sich auch in der Elementaranalyse am geringeren C-Gehalt. Da die Menge an ethanolischer HCl-Lösung zur Bildung des Hydrochlorids an der theoretischen Ausbeute orientiert war, ist auch ein

Abb. 9: ^{13}C-NMR-Spektrum von N-Benzyl-3-aminopropanol-(1) Hydrochlorid
(^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel CD_3OD)





zu hoher Anteil HCl, d.h. erhöhte H- und Cl-Werte feststellbar. Auf eine weitere Umkristallisation wurde verzichtet, da das Produkt zur Umsetzung mit N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid geeignet war.

Zur weiteren Charakterisierung des Produkts wurden ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen, die insbesondere klären sollten, ob tatsächlich eine Benzylierung der Aminogruppe eingetreten war. Die Interpretation, die sich aufgrund des zur Anwendung gelangten Lösungsmittels CD_3OD (deuteriertes Aceton war als Lösungsmittel ungeeignet) relativ schwierig gestaltete, zeigte doch eindeutig, daß die Methylengruppe des Benzylrests an der Aminogruppe gebunden ist.

Aufgrund des ^{1}H-breitbandentkoppelten Spektrums konnten sowohl die chemischen Verschiebungen der aromatischen C-Atome als auch die von C-1 und C-2 festgelegt werden. Das Fehlen eines weiteren Signals in der Region von 55-65 ppm schließt eine Ether- bzw. Acetalbindung zwischen C-1 und C-7´aus. Die Lage der C-3 und C-7´Signale überschneidet sich mit dem Multiplett des CD_3OD. Im ^{1}H- entkoppelten Spektrum ist lediglich das Signal für C-3 mit 46,68 ppm auffindbar; die Breite des Multiplettsignals bei 52,19 ppm sowie die Lage der Triplett-Signale im off-resonance-Spektrum deuten aber auf eine chemische Verschiebung von C-7´in diesem Bereich hin.

3.2.1.3. 3-Benzyl-cyclophosphamid

Es werden 1,7 g (= 6,6 mMol) N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid in 20 ml EE gelöst. Nach Abkühlen auf ca. $0^{o}C$ werden nacheinander unter Rühren 1,33 g (= 6,6 mMol) N-Benzyl-3-aminopropanol-(1) Hydrochlorid und 2,86 ml (= 20 mMol) TEA zugegeben. Nach 12 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das ausgefallene TEA Hydrochlorid durch Vakuumfiltration entfernt.

Die weitere Reinigung erfolgt über Trockensaulenchromatographie (vgl. Abschnitt 2.5.). Dazu werden 10 ml der EE-Lösung mit 10 g Kieselgel am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt und auf die vorbereitete Säule gegeben (Daten der Saule: Trennlänge 90 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm und einem flachen Durchmesser von 50 mm). Entwickelt wird mit ca. 350 ml des DC-Laufmittels I.

Die Detektion der Lage der 3-Benzyl-cyclophosphamid-Bande wird unter UV vorgenommen. Der entsprechende Abschnitt wird herausgeschnitten, mit Chloroform extrahiert (3 x mit je 200 ml) und die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer eingeengt. Das zurückbleibende Öl kristallisiert, wenn man es für mehrere Tage bei $-20^{o}C$ im Gefrierfach beläßt.

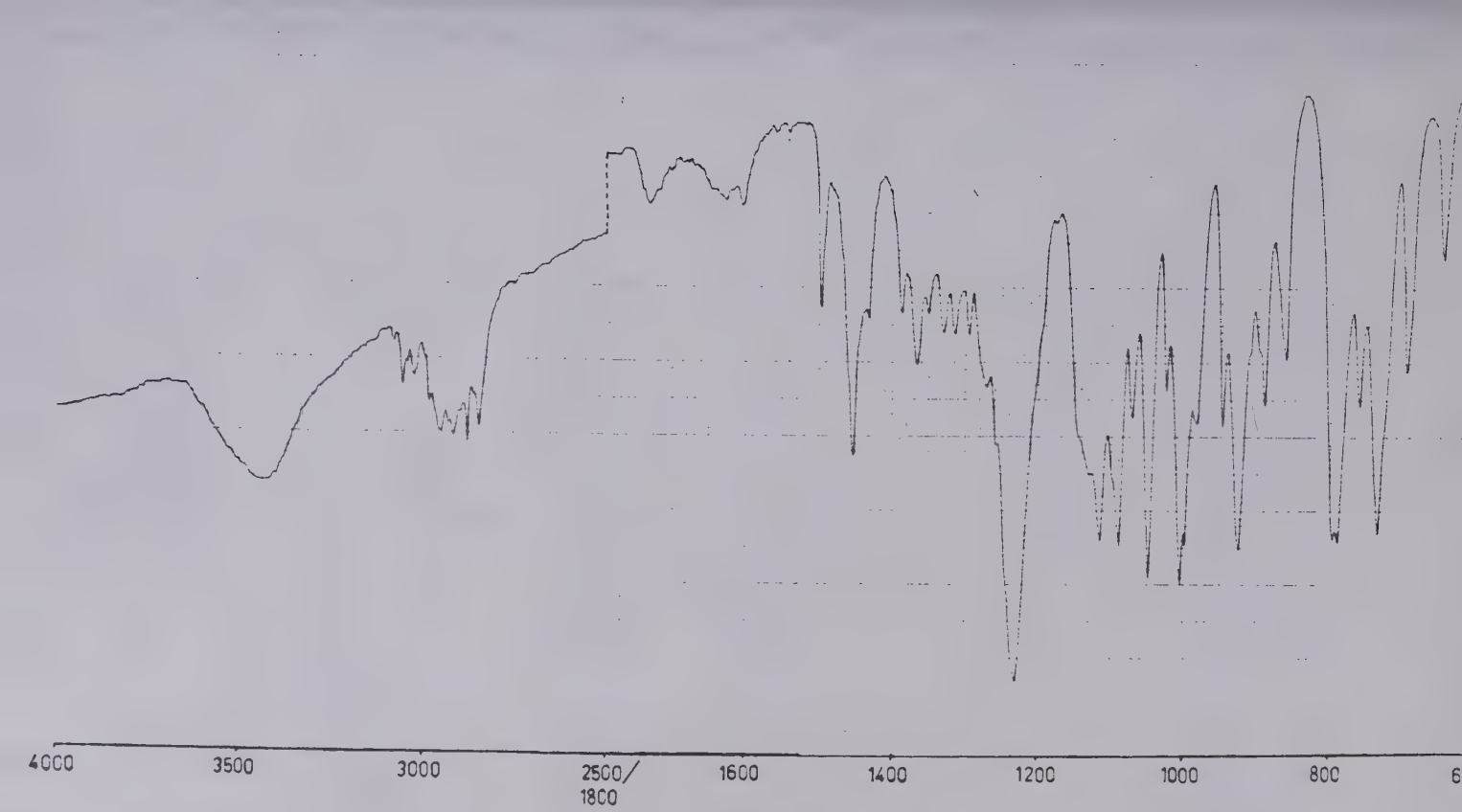
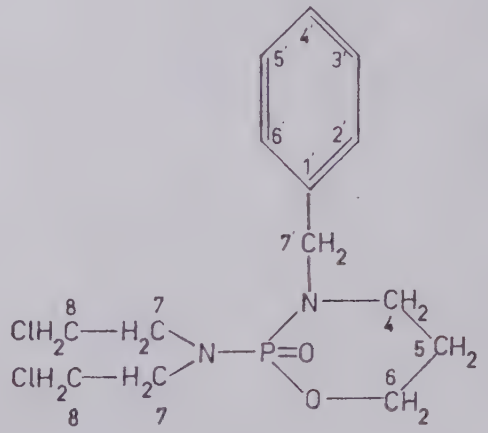


Abb. 10: IR-Spektrum von 3-Benzyl-cyclophosphamid (KBr-disk)

Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-Benzyl-cyclophosphamid
(^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



Die Reinigung der restlichen EE-Lösung erfolgt entsprechend.

Zum Umkristallisieren werden die durchkristallisierten Öle in PE suspendiert und soviel EE zugegeben, bis eine leichte Trübung zurückbleibt. Die Kristallisation erfolgt nach Zugabe von Impfkristallen durch sukzessives Abkühlen auf -20°C über mehrere Tage.

MG: 351,24
Ausbeute: 1,55 g (= 67% d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,19
2. Fp.: 46-47°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 47,87 H = 6,04 N = 7,98 Cl = 20,19
   gef.: C = 47,84 H = 6,21 N = 7,82 Cl = 20,31
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 10)
   3080, 3060 (aromat. C-H st); 2960, 2920, 2890, 2860 (C-H st); 1500, 1450 (CH_2 def); 1230 (P=O st); 1115, 1090 (P-N-C st); 1050 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 11)
   26,13 (C-5, J_{cp} 4,57, Triplett); 42,27 (C-8, Triplett); 46,31 (C-4, Triplett); 49,32 (C-7, J_{cp} 4,57, Triplett); 51,60 (C-7', J_{cp} 2,29, Triplett); 67,17 (C-6, J_{cp} 6,86, Triplett); 127,41 (C-4', Dublett); 128,27 (C-3'/C-5', Dublett); 128,49 (C-2'/C-6', Dublett); 136,71 (C-1', J_{cp} 8,00, Singlett).

Anmerkungen

Die Darstellung von 3-Benzyl-cyclophosphamid erfolgte analog der Vorschrift Abschnitt 3.1.1.2.. Da keine Impfkristalle zur Verfügung standen, wurde über Trockensäule gereinigt. Dieses Verfahren bietet sich aber auch zur Aufarbeitung des Materials an sich an, da die Kristallisation aufgrund des niedrigen Festpunkts bei Vorliegen von Verunreinigungen schwierig und mit geringen Ausbeuten verbunden ist.

Die Charakterisierung der Verbindung mit Hilfe von ^{13}C-NMR und IR bestätigte, daß es sich um das gewünschte Produkt handelt.

- Sämtliche nichtaromatischen C-Atome liegen im off-resonance-Spektrum

als Tripletts vor.

- Die Zuordnung von C-4 und C-7´(P-C-Kopplung) gelang aufgrund dessen, daß auch C-1´eine Spinkopplung zeigt.
- Das IR-Spektrum zeigt die charakteristischen Absorptionen der Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Derivate; eine N-H Streckschwingung ist nicht feststellbar.

3.2.2. Chlorierung von 3-Benzyl-cyclophosphamid

Zur Chlorierung entsprechend Abschnitt 2.3. werden 0,85 g (= 2,5 mMol) 3-Benzyl-cyclophosphamid in 50 ml Chloroform gelöst.

Obwohl die ersten Chloreinleitungen zur Bildung von Pyridin Hydrochlorid führen, zeigen die Chromatogramme zunächst praktisch keine Veränderung, d.h. 3-Benzyl-cyclophosphamid ist die alleinig detektierbare Substanz mit R_f = 0,19. Später erscheint dann darüber mit R_f = 0,33 eine NBP pos., UV neg. Substanz, die erst nur schwach sichtbar ist, im weiteren Verlauf der Chlorierung etwas an Intensität gewinnt. Zu dem Zeitpunkt, wenn fast kein Pyridin mehr im Reaktionsgemisch nachweisbar ist, kommt es daneben noch zur Bildung weiterer hydrophiler bzw. -phober Produkte, die ausnahmslos UV neg. sind und aufgrund dessen, daß sie nur in sehr geringem Ausmaß gebildet werden, keiner Isolierung zugänglich sind.

3.2.3. Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.2.2. mit Thiophenol

Aufgrund der Ergebnisse zur Chlorierung von Cyclophosphamid (vgl. Abschnitt 3.1.2.) und der Umsetzung mit Thiophenol (s. Abschnitt 3.1.3.) bestand die die Möglichkeit, daß es auch bei der Chlorierung von 3-Benzyl-cyclophosphamid zwar zur Bildung eines instabilen Chlorierungsprodukts kommt, welches aber nur in Form des Thiophenolderivates isolierbar ist.

Es wurde daher ein Reaktionsansatz, wie unter 3.2.2. beschrieben, hergestellt und die Reaktion mit Thiophenol im Verlauf der Chlorierung gemäß Abschnitt 2.4. überprüft.

Die DC zeigt im Vergleich zu den Untersuchungen unter 3.2.2. keinerlei Veränderungen; eine Umsetzung hat offenbar nicht stattgefunden.

3.3. Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-(2,4-Dimethoxy)-benzyl-cyclophosphamid

3.3.1. Synthese der Ausgangsverbindungen

3.3.1.1. N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid

Darstellung siehe Abschnitt 3.1.1.1..

3.3.1.2. N-(2´, 4´-Dimethoxy)benzyl-3-aminopropanol-(1) Hydrochlorid (50)

16,6 g (= 0,1 Mol) 2,4-Dimethoxybenzaldehyd werden in 50 ml MeOH gelöst. Unter Eiskühlung gibt man 7,5 g (= 0,1 Mol) 3-Aminopropanol-(1) hinzu und läßt die Lösung unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 5 h werden unter starkem Rühren und Eiskühlung portionsweise 1,14 g (= 0,03 Mol) $NaBH_4$ zugefügt.

Nach Vervollständigung der Reaktion wird das Produkt entsprechend Abschnitt 3.2.1.2. aufgearbeitet.

MG: 261,78
Ausbeute: 16 g (= 61 % d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel III = 0,56, in Laufmittel IV = 0,20
2. Fp.? 118-119°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 55,05 H = 7,72 N = 5,35 Cl = 13,54
   gef.: C = 55,36 H = 7,86 N = 5,32 Cl = 13,84
4. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Signalaufspaltungen erhalten nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel CD_3OD (Abb. 12)
   29,05 (C-2, Triplett); 47,07 (C-3, Triplett), 47,81 (C-7´, Signalaufspaltung nicht bestimmbar); 56,05/56,22 (C-8´/C-9´, Quadruplett); 60,94 (C-1, Triplett); 99,36 (C-3´, Dublett); 106,18 (C-5´, Dublett); 112,54 (C-1´, Singlett); 133,46 (C-6´, Dublett); 160,35 (C-2 , Singlett); 164,93 (C-4´, Singlett).

Anmerkungen

Die analog Abschnitt 3.2.1.2. dargestellte Verbindung war gut zugänglich. Die Interpretation des zur Charakterisierung herangezogenen ^{13}C-NMR Spektrums stieß auf die gleichen Schwierigkeiten, wie dort bereits diskutiert. Die Zuordnung von C-3 und C-7´wurde durch Vergleich der Spektren von N-Benzyl-3-aminopropanol-(1) und seinem 2,4-Dimethoxy-Derivat vorgenommen, wobei angenommen wurde, daß die chemischen Verschiebungen von C-3 bei beiden Verbindungen in etwa gleich sein werden.
Die Zuordnung der Signale im höheren ppm-Bereich zu den verschiedenen aro-

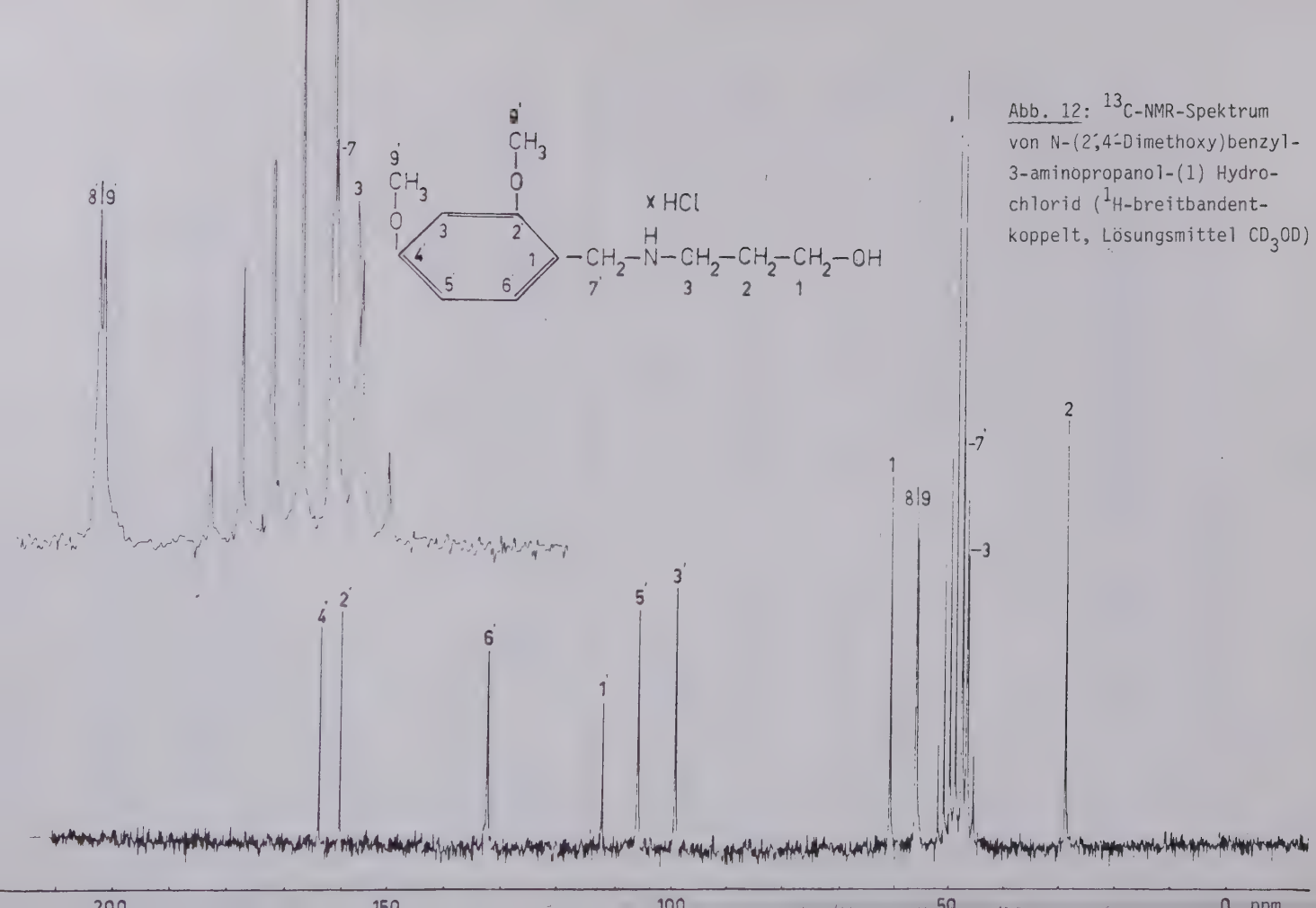


Abb. 12: ^{13}C-NMR-Spektrum von N-(2',4'-Dimethoxy)benzyl-3-aminopropanol-(1) Hydrochlorid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel CD_3OD)

matischen C-Atomen wurde mit Hilfe der vorliegenden Daten zu Verbindungen ähnlichen Typs vorgenommen.

3.3.1.3. 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid

Entsprechend der Vorschrift des Abschnitts 3.3.1.3. werden 1,71 g (= 6,6 mMol) N,N-Bis(2-chlorethyl)phosphamiddichlorid mit 1,73 g (= 6,6 mMol) N-(2',4'-Dimethoxy)benzyl-3-aminopropanol-(1) Hydrochlorid und 2,8 ml (= 20 mMol) TEA reagieren gelassen und über Trockensäulenchromatographie gereinigt.

MG: 411,27
Ausbeute: 1,9 g (= 71% d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,22
2. Fp.: 82-83°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 46,72 H = 6,14 N = 6,81 Cl = 17,24
   gef.: C = 46,43 H = 6,11 N = 6,79 Cl = 17,67
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 13)
   3000 (aromat. C-H st); 2960, 2950, 2840 (C-H st); 1610, 1580 (aromat. C-C st); 1500, 1460, 1450 (CH_2 def); 1265 (C-O-CH_3 st); 1220 (P=O st); 1120, 1080 (P-N-C st); 1045 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen erhalten nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 14)
   26,22 (C-5, J_{cp} 3,43, Triplett); 42,24 (C-8, Triplett); 45,47 (C-7', J_{cp} 2,29, Triplett); 46,28 (C-4, Triplett); 49,52 (C-7, J_{cp} 4,58, Triplett); 55,27/55,15 (C-8'/C-9', Quadruplett); 67,10 (C-6, J_{cp} 6,87, Triplett); 98,45 (C-3',Dublett); 104,19 (C-5', Dublett); 117,08 (C-1', J_{cp} 8,01, Singlett); 130,59 (C-6', Dublett); 158,87 (C-2', Singlett); 160,41 (C-4', Singlett).

Anmerkungen

Darstellung und Reinigung dieser Verbindung gestalteten sich nicht anders als im Fall von 3-Benzyl-cyclophosphamid; die Kristallisationseigenschaften sind hier jedoch günstiger (Fp.: ca. 80°C).

Die Interpretation der Spektrendaten wurde weitgehend durch Vergleich der Daten des Abschnitts 3.2.1.3. bzw. 3.3.1.2. vorgenommen und so die postulierte Struktur wahrscheinlich gemacht.

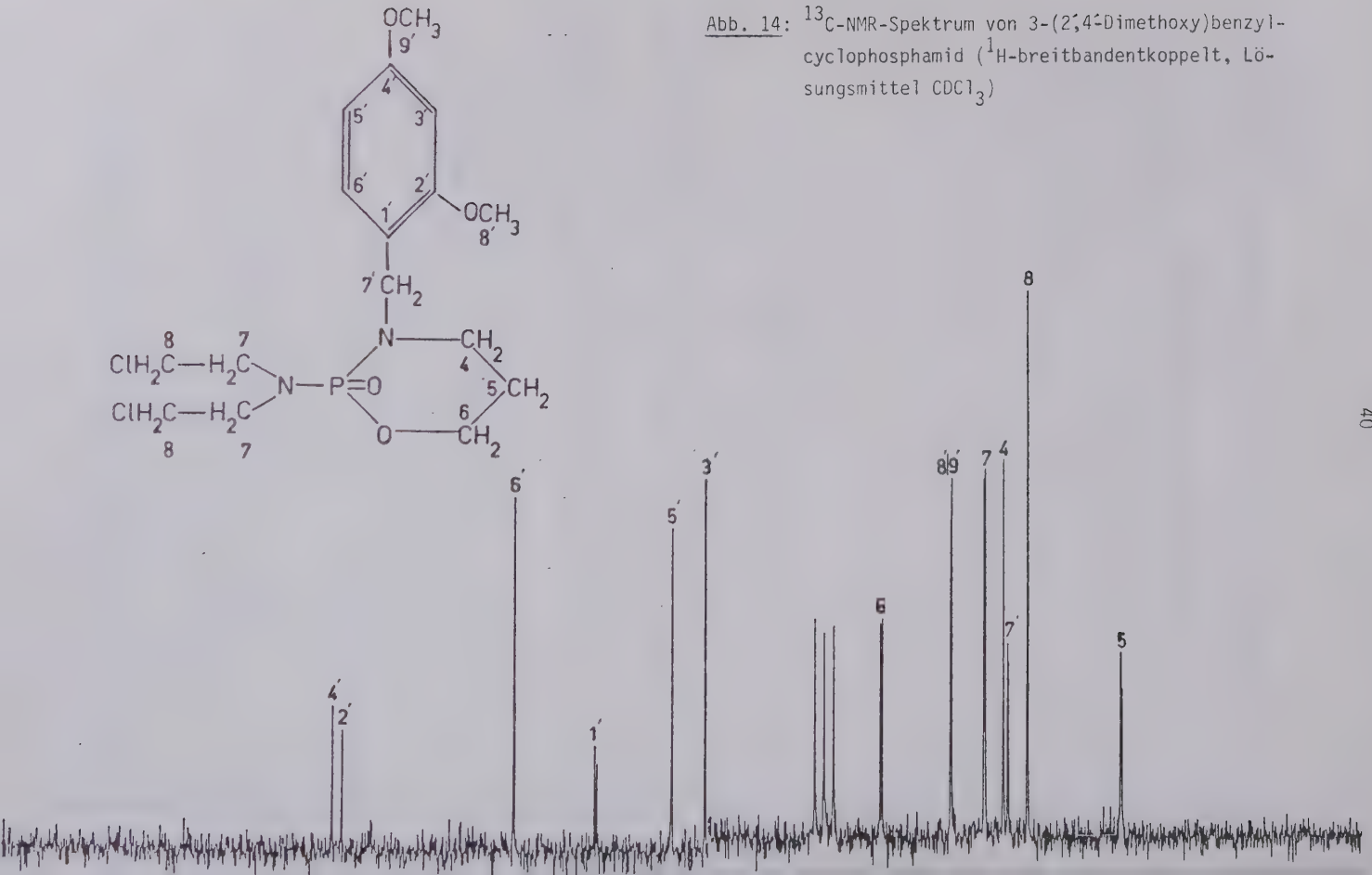


Abb. 14: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-(2',4'-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)

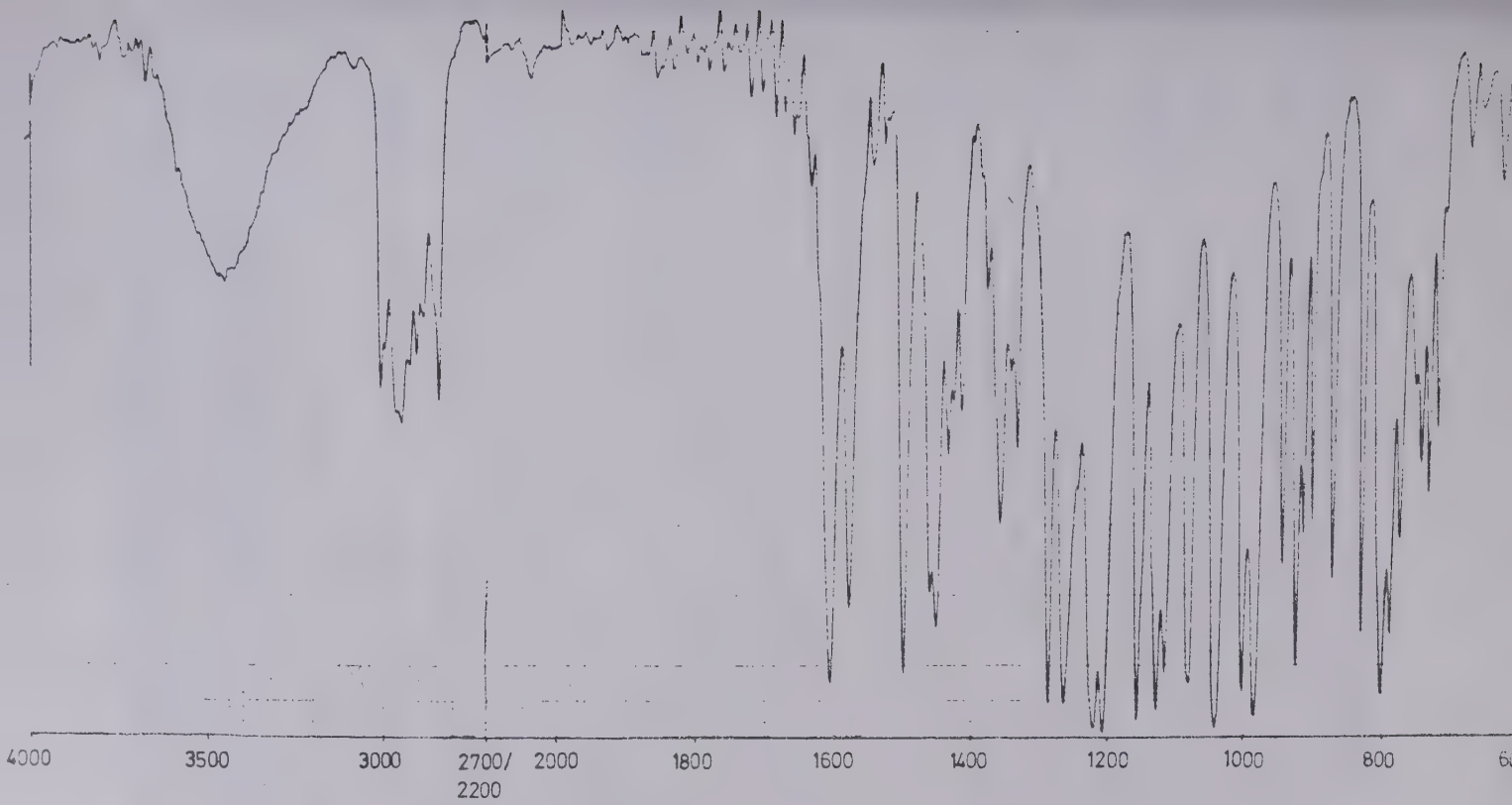


Abb. 13: IR-Spektrum von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid (KBr-disk)

3.3.2. Chlorierung von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid

1,03 g (= 2,5 mMol) 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid werden in 50 ml Chloroform gelöst und eine Chlorierung entsprechend Abschnitt 2.3. durchgeführt.

Ähnlich wie bei der Chlorierung von 3-Benzyl-cyclophosphamid (s. Abschnitt 3.2.2.) ist auch hier zu beobachten, daß es zwar zur Bildung von Pyridin Hydrochlorid kommt, eine Reaktion allerdings dünnschichtchromatographisch nicht nachweisbar ist.

Es kommt aber dann schon sehr rasch zur Bildung eines NBP pos. Anteils, der zunächst als eine Art "tailing" von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid (R_f = 0,22) erscheint, im Verlauf weiterer Chloreinleitung an Intensität zunimmt und als isolierter Substanzfleck mit dem R_f-Wert von 0,14 detektierbar ist. Zu diesem Zeitpunkt ist auch eindeutig feststellbar, daß diese Substanz keine Fluoreszenzabsorption zeigt.

In dem Maße, wie der Anteil dieser Verbindung im Reaktionsgemisch zunimmt, kommt es, neben einer entsprechenden Verminderung von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid, parallel zu der Bildung einer weiteren Substanz (NBP pos., UV wahrscheinlich neg.) mit R_f = 0,06, deren Anteil ebenfalls im Verlauf der Chlorierung zunimmt, jedoch anteilmäßig weit weniger ins Gewicht fällt.

Gegen Ende, d.h. wenn fast die gesamte Menge Ausgangsmaterial verschwunden ist, zeigt sich noch eine fast nicht detektierbare UV neg., NBP schwach pos. Substanz mit R_f ca. 0,31.

Nach längerem Stehen, insbesondere bei Raumtemperatur, verändert sich die quantitative Zusammensetzung im Sinn einer Abnahme der Substanz mit dem R_f = 0,14, relativer Zunahme der Verbindung mit R_f = 0,06 und Neubildung von Cyclophosphamid (nachgewiesen durch DC in Laufmittel II).

3.3.2.1. Darstellung, Isolierung und Charakterisierung von 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid

Reaktionsansatz entsprechend Abschnitt 3.3.2..

Die Chloreinleitung wird so dosiert, daß das gewünschte Produkt mit dem R_f = 0,14 einen relativ hohen Anteil im Reaktionsgemisch erreicht hat (DC-Kontrolle in Laufmittel V).

Nach vollständigem Einrotieren der Chloroform-Lösung wird in ca. 50 ml EE

aufgenommen und vom Pyridin Hydrochlorid abgesaugt. Zu der verbliebenen Lösung werden 10 g Kieselgel gegeben, bis zur Trockene das Lösungsmittel abgezogen und eine Trockensäulenchromatographie (s. Abschnitt 2.5.) durchgeführt. Säulendaten: Trennlänge 120 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm und einem flachen Durchmesser von 38 mm; Elutionsmittel: Laufmittel V.

Nach vollständiger Entwicklung wird die Säule im in Frage kommenden Bereich fraktioniert (vgl. dazu Abschnitt 3.1.2.3.). Die Extraktion der Kieselgelfraktionen erfolgt mit EE (jeweils 5 x mit je 150 ml). Die nur das Produkt enthaltenden Fraktionen werden gepoolt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Versuche, das zurückbleibende Öl zu kristallisieren, schlugen fehl; es wurde daher unmittelbar in dieser Form analysiert und im Tierversuch eingesetzt.

MG: 319,22
Ausbeute: 130 mg

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,14
2. Elementaranalyse:
   ber.: C = 37,63 H = 6,64 N = 8,78 Cl = 22,21
   gef.: C = 37,76 H = 6,76 N = 8,53 Cl = 21,45
3. IR-Daten in cm^{-1}, Öl auf NaCl-Preßling (Abb. 15)
   2960, 2930, 2870 (C-H st); 1450, 1440 (CH_2 def); 1280-1260 (P=O st, H_2C-O-CH_2 st as); 1120 (P-N-C st); 1040 (P-O-C st).
4. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 16)
   14,99 (C-11, Quadruplett); 26,02, J_{cp} 4,57, Triplett); 42,16 (C-8, Triplett); 46,08 (C-4, Triplett); 49,13 (C-7, J_{cp} 4,57, Triplett); 63,47 (C-10, Triplett); 67,34 (C-6, J_{cp} 6,86, Triplett); 79,24 (C-9, J_{cp} 5,72, Triplett).

Anmerkungen

Die Darstellung des Chlorierungsprodukts von 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid gelang recht gut. Bestimmend für die Ausbeute war aber auch hier der Abbruch der Chlorierung zum optimalen Zeitpunkt; ansonsten entstanden mehr oder weniger Nebenprodukte, deren Separierung vom gewünschten Produkt aufgrund vergleichbarer Verteilungs- und Adsorptionseigenschaften Schwierigkeiten bereitete. Erschwerend kam hinzu, daß keinerlei Fluoreszenzabsorption

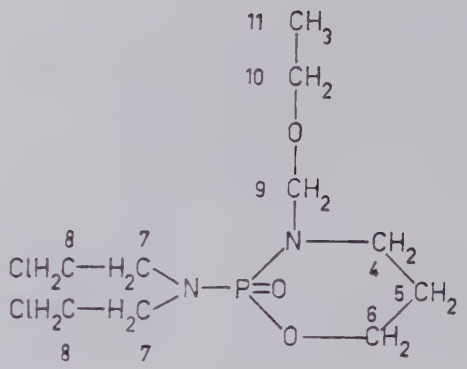
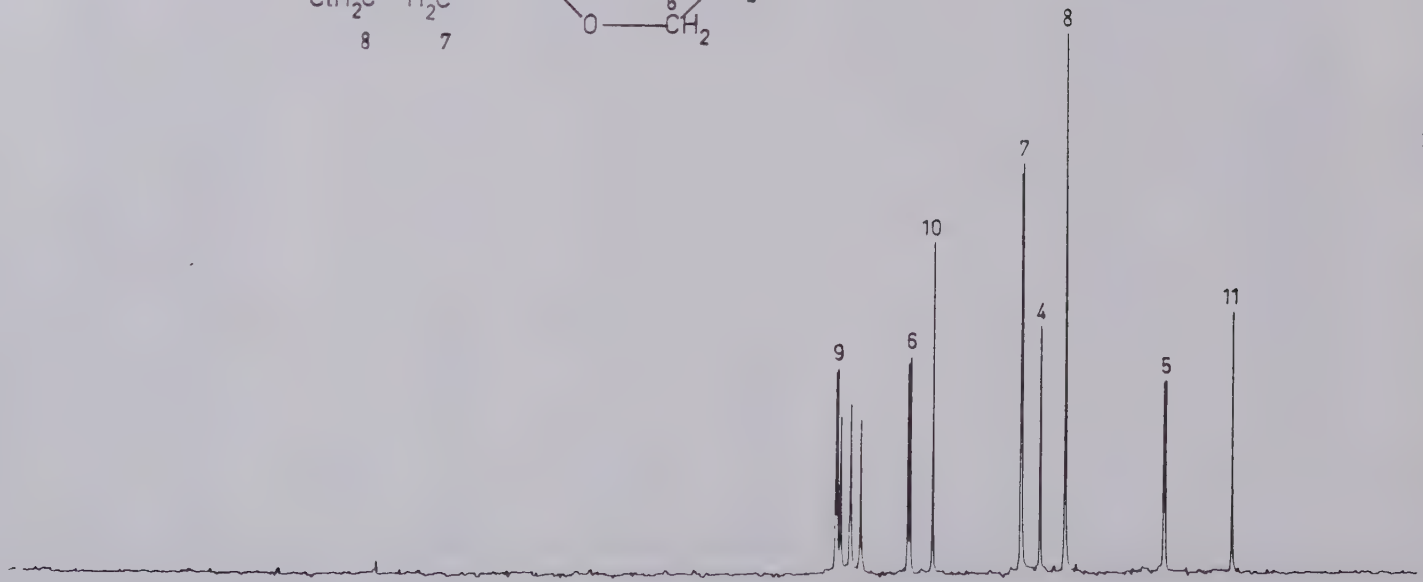


Abb. 16: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-Ethoxymethylcyclophosphamid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



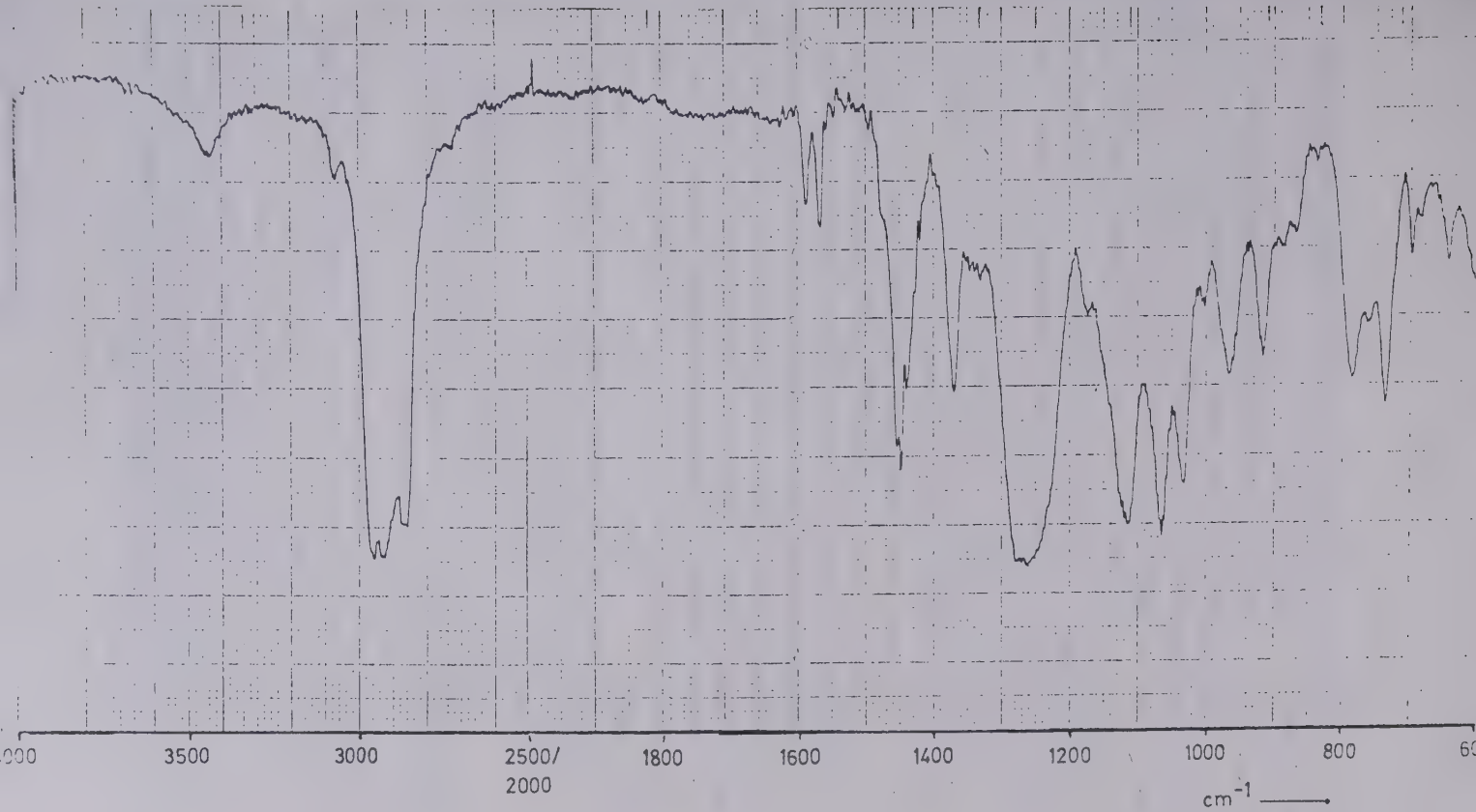


Abb. 15: IR-Spektrum von 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid (Öl auf NaCl-Preßling)

beobachtbar ist und so eine Isolierung nur durch Fraktionierung der Trennsäule im erwarteten R_f-Bereich möglich war.

Obwohl die isolierte Substanz einheitlich war (DC, ^{13}C-NMR), konnte trotz intensiver Bemühungen keine Kristallisation erreicht werden. Eine mögliche Ursache ist darin zu sehen, daß die Substanz auch bei Aufbewahren im Gefrierfach mit der Zeit zersetzt wird (s.o.). Das Produkt wurde daher sofort nach Darstellung als Öl charakterisiert und für den biologischen Test eingesetzt.

Die Strukturaufklärung stützt sich im wesentlichen auf die ^{13}C-NMR-Analyse (die Daten der Elementaranalyse stimmen mit der postulierten Struktur überein).

- Die chemischen Verschiebungen von C-5, C-6, C-7 und C-8 stimmen mit denen, die für Cyclophosphamid erhalten wurden, überein.
- Sämtliche Signale, außer dem Signal bei 14,99 ppm = Quadruplett, spalten in Tripletts auf; daraus folgt, daß eine Substitution an C-Atomen des Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Gerüsts ausgeschlossen werden kann.
- Die chemische Verschiebung von 79,24 ppm deutet auf Bindung des Kohlenstoffs an zwei elektronegative Substituenten hin, die C-P-Spinkopplung macht eine unmittelbare Bindung an N-3 wahrscheinlich. Als zweiter Substituent kommt aufgrund der Elementaranalyse nur Sauerstoff in Frage, was auch mit der chemischen Verschiebung von C-10 mit 63,47 ppm gut übereinstimmt.
- Die Breite der IR-Bande bei 1270 cm^{-1} deutet darauf hin, daß vermutlich zwei verschiedene Bindungen in diesem Bereich absorbieren, die als P=O st und Ether-Bindung interpretiert wurden.

3.3.3. Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.3.2. mit Thiophenol

Der Reaktionsansatz entspricht dem des Abschnitts 3.3.2., die Umsetzung mit Thiophenol erfolgte analog zu Abschnitt 2.4..

Der Reaktionsablauf zeigt praktisch keine Unterschiede zur Chloreinleitung. Erst nach Auftreten der Substanz mit dem R_f = 0,06 (Chlorierungsgemisch) ist eine Verbindung mit dem R_f = 0,51 sichtbar (NBP schwach pos.), die aber aufgrund des geringen Anteils nicht isoliert werden konnte.

Interessant ist, daß, im Vergleich zum unbehandelten Chlorierungsgemisch, in den zum gleichen Zeitpunkt entnommenen Proben nach Zugabe von Thiophenol sowohl weniger Ausgangssubstanz als auch mehr von der Verbindung mit dem R_f = 0,14 nachweisbar ist.

3.4. Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid

3.4.1. Synthese der Ausgangsverbindungen

3.4.1.1. Cyclophosphamid x H_2O

Darstellung siehe Abschnitt 3.1.1.2..

3.4.1.2. Phenylsulfenylchlorid (51)

25 ml Chloroform werden in einer Eis-Kochsalz-Mischung auf ca. -15°C abgekühlt. Man leitet nun 3 g (= 42 mMol) Chlor ein und tropft langsam eine Lösung von 2,2 g (= 20 mMol) Thiophenol in 25 ml Chloroform zu. Die anfänglich hellgrün gefärbte Chlor-Lösung wird daraufhin rot. Diese Lösung wird ohne weitere Charakterisierung zur Darstellung von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid eingesetzt.

3.4.1.3. 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid

3,5 g (= 12,5 mMol) Cyclophosphamid x H_2O werden in 50 ml Chloroform gelöst, die Lösung mit $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 25 ml eingeengt. Zu dieser Lösung gibt man unter beständigem Rühren und Eiskühlung 35 ml (= 14 mMol) der unter 3.4.1.2. dargestellten Phenylsulfenylchlorid-Lösung. Anschließend werden noch portionsweise 3 ml (= 38 mMol) trokkenes Pyridin zugegeben. Eine DC in Laufmittel V zeigt, daß der größte Teil von Cyclophosphamid zum gewünschten Produkt reagiert hat.

Die Lösung wird vollkommen einrotiert und der Rückstand mit 30 ml EE versetzt. Das ausgefallene Pyridin Hydrochlorid wird durch Vakuumfiltration entfernt und 10 ml dieser Lösung über Trockensäulenchromatographie (vgl. Abschnitt 2.5.) gereinigt; Elutionsmittel: ca. 350 ml EE. Säulendaten: 120 cm Trennlänge, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm und einem flachen Durchmesser von 38 mm. Die Detektion der Substanzbande erfolgt mittels Fluoreszenzabsorption bei 254 nm.

Nach Entwicklung des Chromatogramms wird der entsprechende Säulenabschnitt herausgeschnitten, mit EE extrahiert (3 x mit je 300 ml) und die resultierenden Lösungen am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Dabei fällt das Produkt z.T. bereits aus. Umkristallisiert wird, indem man das halbfeste Öl bei Raumtemperatur in wenig Chloroform löst und das Lösungsmittel bei 0°C durch Evakuieren im Exsikkator langsam abdestilliert. Wenn die Kristallbildung einsetzt, wird die Kristallsuspension bei -20°C aufbewahrt.

Nach 1-2 Tagen kann man die überstehende Flüssigkeit abpipettieren und das Produkt über Paraffin im Exsikkator trocknen.
Die restliche EE-Lösung wird auf demgleichen Weg gereinigt.

MG: 369,27
Ausbeute: 2,68 g (= 58% d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,34
2. Fp.: 102-103°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 42,28 H = 5,20 N = 7,59 S = 8,68 Cl = 19,20
   gef.: C = 41,86 H = 5,16 N = 7,58 S = 8,69 Cl = 19,44
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 17)
   3080, 3040 (aromat. C-H st); 2990, 2960, 2880 (C-H st); 1580 (aromat. C-C st); 1480, 1450 (CH_2 def); 1235 (P=O st); 1125 (P-N-C st); 1050 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen erhalten nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 18)
   27,19 (C-5, J_{cp} 3,43, Triplett); 41,90 (C-8, Triplett); 49,64 (C-7, J_{cp} 4,58, Triplett); 54,47 (C-4, J_{cp} 4,58, Triplett); 67,21 (C-6, J_{cp} 6,87, Triplett); 126,78 (C-2´/C-6´, Dublett); 127,29 (C-4´, Dublett); 129,00 (C-3´/C-5´, Dublett); 136,57 (C-1´, Singlett).

Anmerkungen

Die Synthese von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid bereitete relativ geringe Schwierigkeiten. Allerdings wurde die Darstellung nicht optimiert, d.h. das Phenylsulfenylchlorid wurde ungereinigt eingesetzt, sodaß es je nach Präparation etwas unterschiedliche Umsätze gab und neben dem gewünschten Produkt noch einige andere nicht identifizierte Verbindungen auftraten.

Die Isolierung und Kristallisation waren problemlos. Die Identität der Verbindung wurde weitgehend durch Vergleich der chemischen Verschiebungen von 3-Chlor-cyclophosphamid und Produkt ermittelt.

- Sämtliche nichtaromatischen C-Atome liegen im off-resonance-Spektrum als Tripletts vor.
- C-4 zeigt eine etwas geringere Verschiebung (54,47 ppm) als bei 3-Chlor-cyclophosphamid (56,92 ppm), entsprechend der abnehmenden Elektronega-

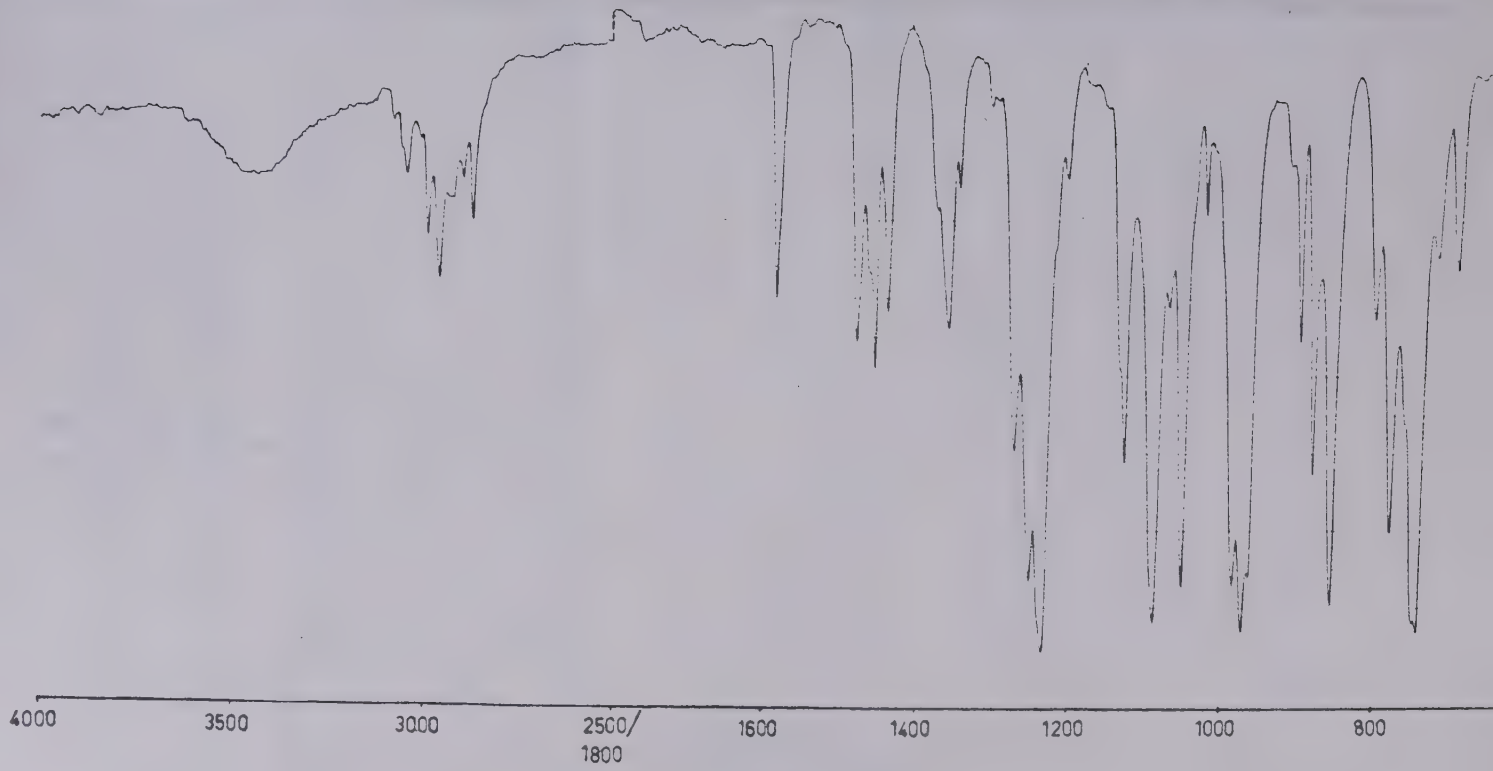
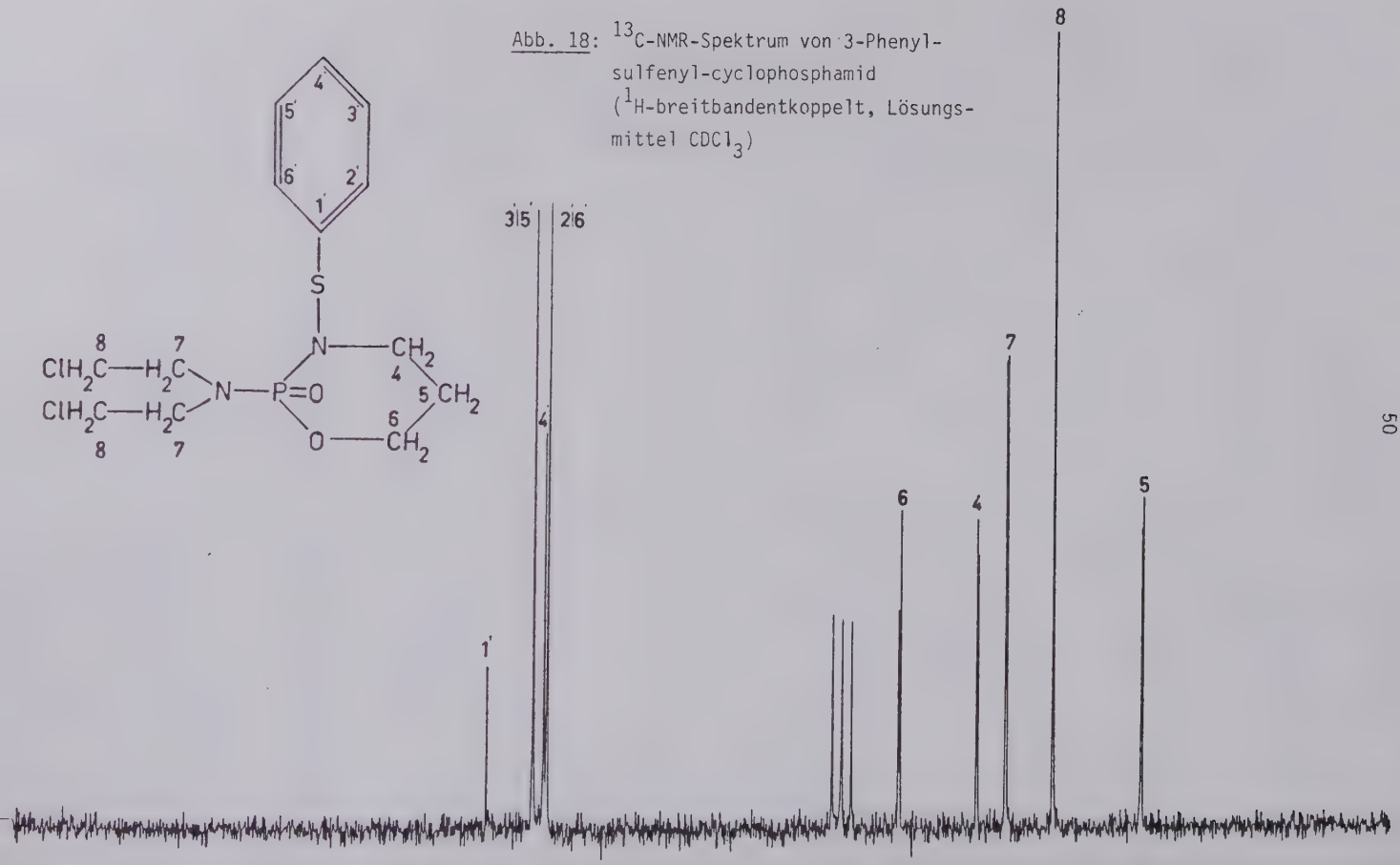


Abb. 17: IR-Spektrum von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid (KBr-disk)

Abb. 18: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



tivität des N-Substituenten.
- C-1' ist weitgehend entschirmt (vgl. dazu auch 3.1.3.1.).
- Im IR-Spektrum gibt es neben den charakteristischen Banden der Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Derivate keinerlei Hinweise auf freie oder assoziierte N-H-Absorptionen.

3.4.2. Chlorierung von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid

0,92 g (= 2,5 mMol) 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid werden in 50 ml Chloroform gelöst und entsprechend Abschnitt 2.3. einer Chlorierung unterworfen.

Schon die erste Chloreinleitung zeigt aufgrund der Bildung von Pyridin Hydrochlorid eine Reaktion an, die jedoch chromatographisch nicht nachweisbar ist, d.h. 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid mit dem R_f-Wert von 0,34 ist die einzige mit UV und NBP detektierbare Substanz.

Dieses Bild ändert sich zunächst auch nach weiterer Chloreinleitung nicht; danach kommt es aber zu einer quantitativ unbedeutenden teilweisen Zersetzung zu Cyclophosphamid und Phenylsulfenylchlorid. Das entstandene Cyclophosphamid wird offenbar im Zuge weiterer Chloreinleitungen in 3-Position zu 3-Chlor-cyclophosphamid substituiert, da die DC bald die Bildung einer Substanz mit R_f = 0,28 anzeigt, die NBP pos. ist, das gleiche Laufverhalten wie 3-Chlor-cyclophosphamid (vgl. Abschnitt 3.1.2.) zeigt, aufgrund der geringen Menge und der Überlappung mit der Pyridinbande ist eine UV-Absorption nicht eindeutig nachweisbar.

Gleichzeitig mit dem Auftreten dieses Substanzflecks kommt es zur Bildung einer Substanz mit R_f = 0,15, die aufgrund der starken, mit 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid vergleichbaren UV-Absorption und einer ähnlichen Färbung der NBP-Reaktion (leicht violett) ein Derivat dieser Verbindung sein könnte. Die Intensität dieses Substanzflecks nimmt im weiteren Verlauf der Chlorierung nur unwesentlich zu; im Gegenteil, korrespondierend mit dem Verschwinden des Pyridins aus dem Reaktionsgemisch kommt es zu einer Verminderung unter gleichzeitiger Zunahme von Cyclophosphamid. In diesem Stadium ist nur noch wenig Ausgangsmaterial und wenig 3-Chlor-cyclophosphamid vorhanden.

3.4.2.1. Darstellung, Isolierung und partielle Charakterisierung eines Chlorierungsprodukts

Der Reaktionsansatz entspricht dem des Abschnitts 3.4.2.. Es wird nur soviel Chlor eingeleitet, wie zur Darstellung des gewünschten Produkts notwendig ist

(DC-Kontrolle, Laufmittel V).

Die Chloroform-Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt und in 50 ml EE aufgenommen. Zur Isolierung über Trockensäulenchromatographie (Abschnitt 2.5.) wird vom ausgefallenen Pyridin Hydrochlorid abgenutscht, zu der Lösung 10 g Kieselgel gegeben und bis zur Trockene einrotiert. Die Säulendaten lauten: Trennlänge 120 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm und einem flachen Durchmesser von 38 mm; eluiert wird mit EE.

Nach vollständiger Entwicklung des Chromatogramms sind durch Fluoreszenzabsorption 3 distinkte Substanzbanden erkennbar (Produkt, 3-Chlor-cyclophosphamid und 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid). Sowohl das Produkt als auch 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid werden mit EE extrahiert (die Ausgangsverbindung mit 3 x 300 ml, Weiterverarbeitung siehe Abschnitt 3.4.1.3.; die Produktbande mit 5 x 250 ml). Das nach Einengen der vereinigten EE-Auszüge anfallende ölige Produkt wird zur Kristallisation einige Tage bei -20°C aufbewahrt, wobei es vollständig durchkristallisiert. Man gibt etwas PE hinzu und löst vorsichtig bei Raumtemperatur mit EE. Nach Zugabe von einigen Impfkristallen und Lagerung bei -20°C kristallisiert das Produkt weitgehend aus.

MG: 350-400
Ausbeute: 40 mg

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,15
2. Fp.: 99-100°C
3. Elementaranalyse:
   gef.: C = 40,03 H = 5,36 N = 6,93 S = 8,47 Cl = 18,98
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 19)
   3580; 3470 (N-H st); 3060 (aromat. C-H st); 3000, 2960, 2920 (C-H st); 1635 (aromat. C-C st); 1465, 1455 (CH_2 def); 1240 (P=O st); 1125, 1075 (P-N-C st); 1050 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 20)
   25,88 (CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_2, J_{cp} 5,72, Triplett); 39,39 ($\underline{C}H_2$-NH, Triplett); 42,07 ($\underline{C}H_2$-Cl, Triplett); 49,12 ($\underline{C}H_2$-N, J_{cp} 4,58, Triplett); 67,90 ($\underline{C}H_2$-O, J_{cp} 3,43, Triplett); 125,53 bzw. 129,23 (aromat. C-2´/C-6´bzw. C-3´/C-5´, jeweils Dublett); 131,62 (aromat. C-4´, Dublett); 141,63 (aromat. C-1´, J_{cp} 3,43, Singlett).

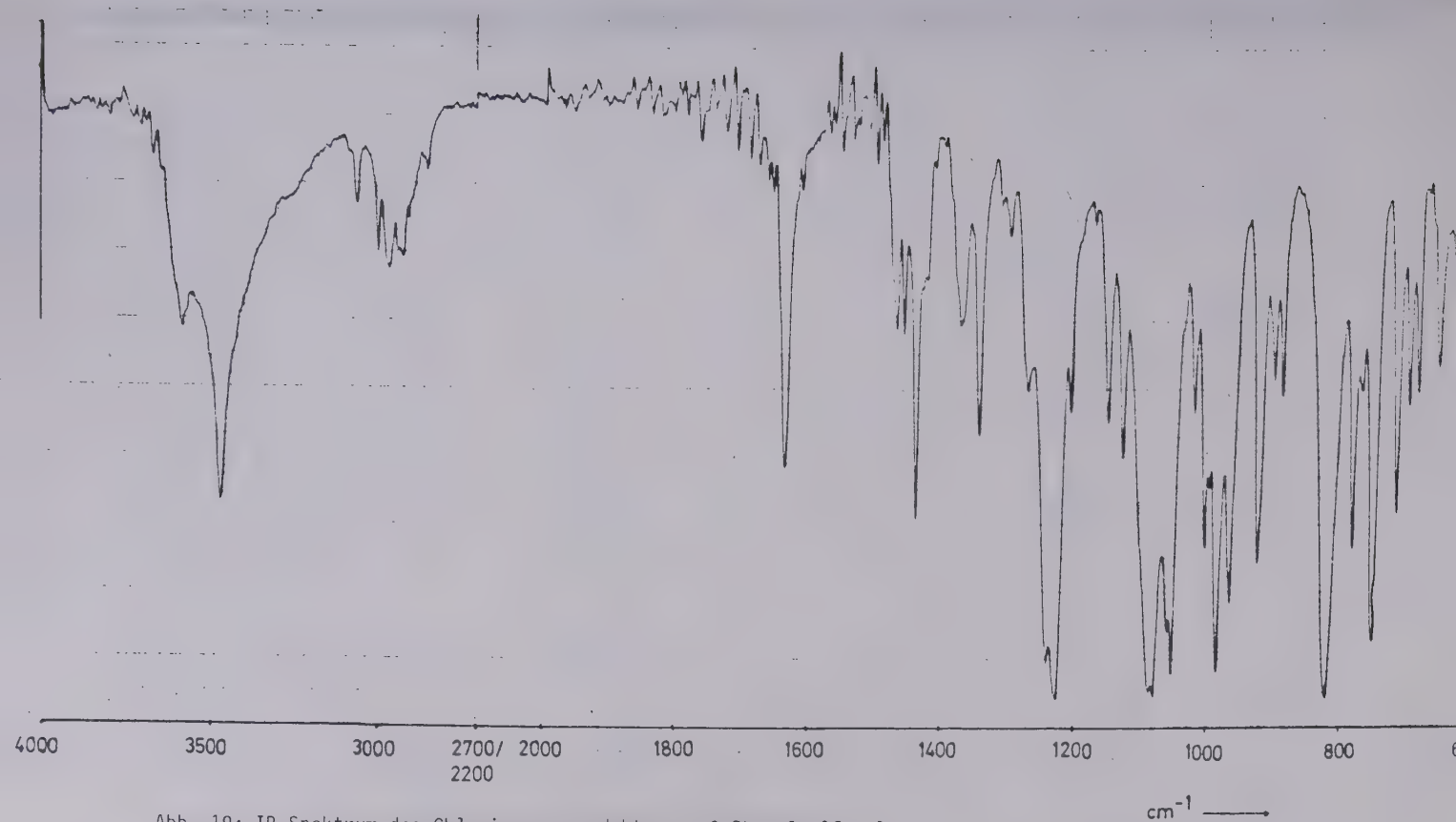
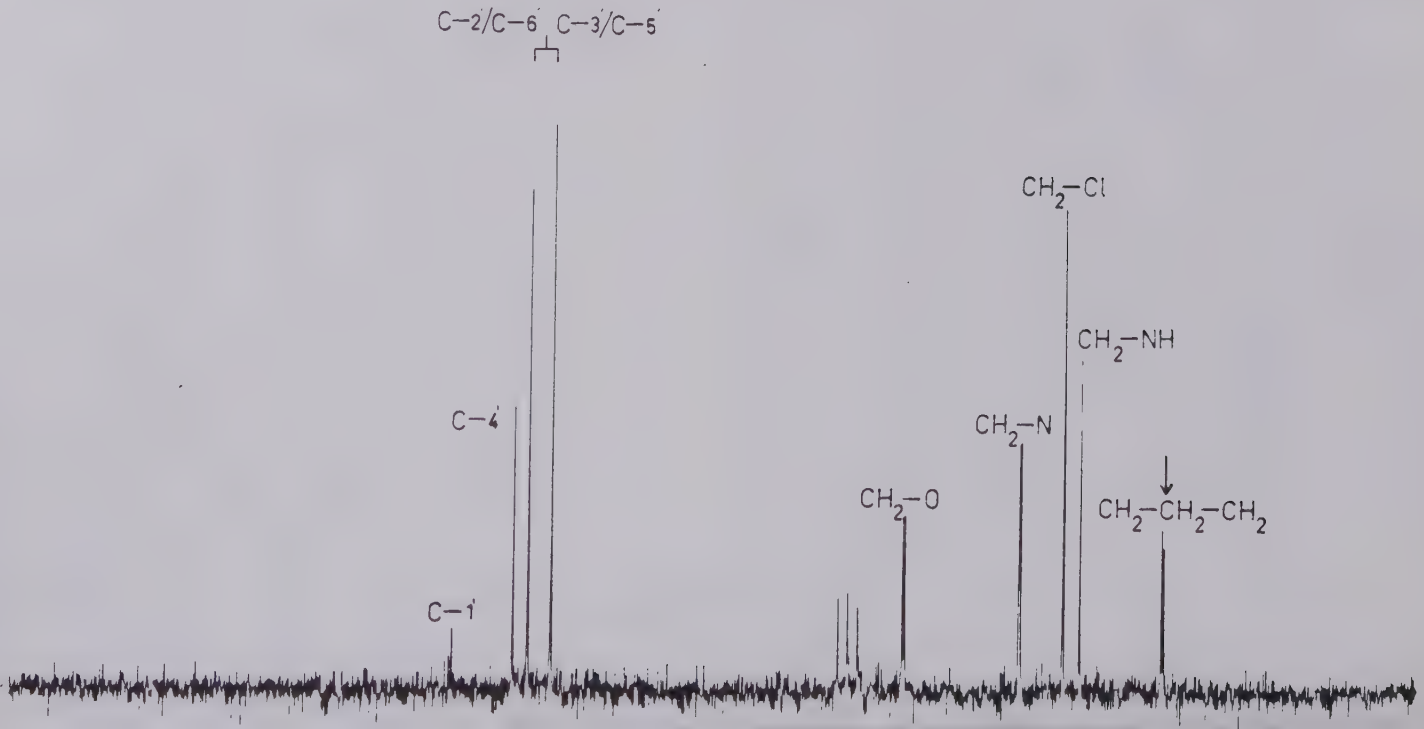


Abb. 19: IR-Spektrum des Chlorierungsprodukts von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid (KBr-disk)

Abb. 20: ^{13}C-NMR-Spektrum eines Chlorierungsprodukts von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



6. ^{1}H-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 21)
1,82-2,13 (CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2, m, 2 H); 2,73-3,04 (m, 1 H); 3,33-3,84 (2 x N-$\underline{CH_2}$-$\underline{CH_2}$-Cl, $\underline{NH}$-$\underline{CH_2}$, m, 10-11 H); 4,00-4,29 (m, 1 H); 4,29-4,66 ($\underline{CH_2}$-O, m, 2 H); 7,40-7,70 ($C_6\underline{H_5}$, m, 5 H).

Anmerkungen

Ähnliche Probleme wie bei der Darstellung von 3-Ethyl-4-phenylsulfenylcyclophosphamid traten auch hier auf, d.h. die Ausbeute ist in erster Linie davon abhängig, inwieweit es gelingt, die Reaktion zu dem Zeitpunkt zu stoppen, wenn der Anteil des Produkts im Reaktionsgemisch maximal ist.

Isolierung und Kristallisation gestalteten sich recht einfach.

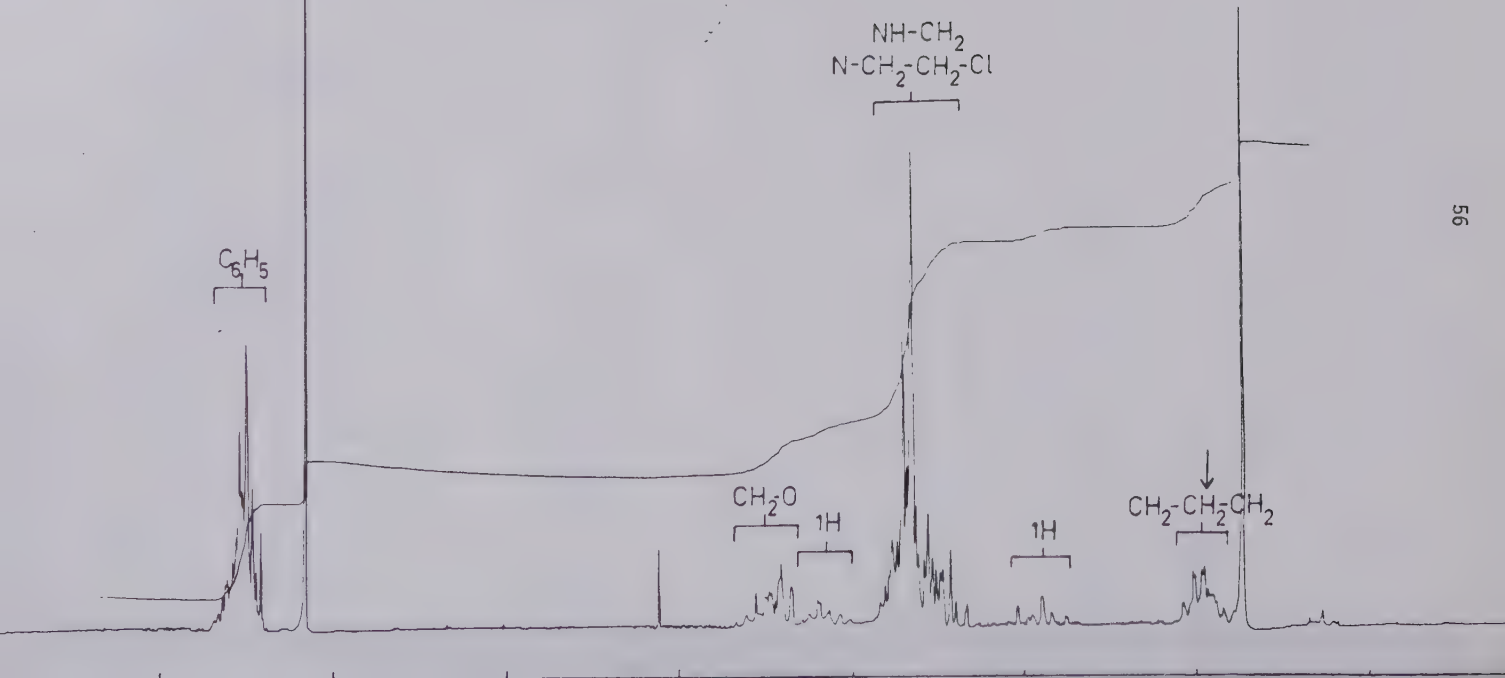
Trotzdem ist eine Charakterisierung nicht möglich gewesen, da

- die Ergebnisse der Elementaranalyse stark von Präparation zu Präparation schwankten und auch davon abhängig waren, wie die Substanz von Lösungsmittel begreit wurde (Exsikkator-Vakuum bei Raumtemperatur oder 4°C);
- im FD-Massenspektrum kein Molekularmassenpeak identifiziert werden konnte, d.h. das für derartige Verbindungen typische Isotopenmuster fehlt vollständig (auf eine Wiedergabe der Daten wurde daher verzichtet);
- eine eindeutige Zuordnung mit Hilfe von ^{13}C-NMR bzw. IR nicht möglich ist;
- die Zuordnungen der Signale des ^{1}H-NMR-Spektrums nur unzureichend getroffen werden konnten; insbesondere konnte nicht geklärt werden, wieviel Protonen insgesamt am Molekülaufbau beteiligt sind.

Aufgrund vergleichender Interpretation kann aber folgendes festgestellt werden.

- Das IR-Spektrum zeigt deutlich eine Absorption bei 3470, neben einer Bande geringerer Intensität bei 3580 cm^{-1}; daraus folgt: mindestens 1 Proton gebunden an N, O-H Valenzschwingung nicht gesichert.
- Aufgrund der starken IR-Bande bei 1050 cm^{-1} darf eine P-O-C Bindung angenommen werden, die P-N-C Absorption bei 1075 cm^{-1} ist dagegen unsicher; es folgt daraus: der Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Ring ist unter Umständen aufgelöst, Vorliegen eines offenkettigen Phosphorsäure-Derivats.
- Die chemischen Verschiebungen der nichtaromatischen C-Atome ähneln in starkem Maß denjenigen von Cyclophosphamid (sämtlich als Triplett vorliegend), obwohl der Aromat, erkennbar an der C-P-Kopplung und der star-

Abb. 21: ^{1}H-NMR-Spektrum eines Chlorierungsprodukts von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid (Lösungsmittel $CDCl_3$)



ken Entschirmung des C-1´in kovalenter Bindung vorliegt; auch hieraus resultiert die Annahme einer offenkettigen Form mit Bindung des Phenylsulfenyl-Rests
a) über ein elektronegatives Atom (z.B. Sauerstoff)
oder
b) direkt, nach Oxidation des 2-wertigen Schwefels zur 4-wertigen S=O Gruppierung,
an den Phosphor.

3.4.3. Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.4.2. mit Thiophenol

Der Reaktionsansatz entspricht demjenigen des Abschnitts 3.4.2., die Umsetzung mit Thiophenol folgt Abschnitt 2.4..

Unter den Reaktionsbedingungen kommt es sofort zu einer teilweisen Reduktion des 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamids zu Cyclophosphamid. Zum Zeitpunkt des Auftretens von 3-Chlor-cyclophosphamid und der unter Abschnitt 3.4.2.1. isolierten Verbindung zeigt sich das folgende Bild: Zunahme des Cyclophosphamid-Anteils (Reduktion von 3-Chlor-cyclophosphamid), konstanter Anteil von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid, gleicher Anteil der unbekannten Verbindung wie im Chlorierungsgemisch.

Korrespondierend zu den DC`s der Chlorierungsreaktion kommt es gegen Ende (d.h. Abnahme des Pyridingehalts bis auf Null) zur Bildung eines sehr großen Anteils Cyclophosphamid und nur noch wenig 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid ist detektierbar; ansonsten keine nennenswerte Bildung von Produkten.

3.5. Untersuchungen zur Derivatisierung von 3-t-BOC-cyclophosphamid

3.5.1. Synthese der Ausgangsverbindungen

3.5.1.1. Cyclophosphamid x H_2O

Darstellung siehe Abschnitt 3.1.1.2..

3.5.1.2. tert.-Butyloxycarbonyl-azid (52,53)

30 g (= 0,23 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-hydrazid werden in einem Gemisch aus 27 g Eisessig und 18 ml Wasser gelöst, mit einer Eis/Kochsalz-Mischung auf ca. 5°C abgekühlt und eine Lösung von 17,2 g $NaNO_2$ in 20 ml Wasser unter starkem Rühren so schnell zugetropft, daß die Temperatur immer zwischen 5°C und 8°C bleibt. Nach vollständiger Zugabe der Nitrit-Lösung wird noch unter Eiskühlung und bei Raumtemperatur für jeweils 1 h weiterrühren gelassen.

Zum Reaktionsgemisch werden anschließend 40 ml Wasser zugegeben und das Produkt mit Ether (2 x mit je 50 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden nun mit 50 ml Wasser, 4 x mit 50 ml 1 N $NaHCO_3$-Lösung und 2 x mit je 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Ether-Lösung über $MgSO_4$ wird zunächst das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei ca. 10°C abgezogen, anschließend das zurückbleibende gelbe Öl bei 36-38°C unter Wasserstrahlvakuum (ca. 14 mm Hg) destilliert (Badtemperatur ca. 40-42°C).

Wegen Explosionsgefahr wird das nun farblose Produkt mit Dioxan bis zu einer Konzentration von 4 M verdünnt.

MG: 143,2
Ausbeute: 23 g (= 70% d.Th., 4 M Lösung = aufgefüllt mit Dioxan auf 40 ml)

3.5.1.3. 3-t-BOC-cyclophosphamid

8,4 g (= 30 mMol) Cyclophosphamid x H_2O werden in 200 ml Chloroform gelöst, mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das zurückbleibende Öl wird in 250 ml Ether aufgenommen und 11,3 ml der 4 M t-BOC-azid-Lösung in Dioxan zugefügt. Die Reaktion wird durch Zugabe von frisch geschnittenem Natrium gestartet. Das Gemisch wird nun mehrere Tage bei Raumtemperatur rühren gelassen, wobei immer wieder frisches Natrium zugegeben wird. Der Verlauf der Reaktion wird mittels DC in Laufmittel II ständig überprüft.

Sofort nach Zugabe von Natrium entsteht ein Produkt, welches mit R_f = 0,57 wenig oberhalb von Cyclophosphamid sichtbar ist. Dieses Produkt konnte auf anderem Wege dargestellt und charakterisiert werden (s. Abschnitt 3.5.4.). Das gewünschte Produkt entsteht erst später mit R_f = 0,81 in Laufmittel II bzw. 0,29 in Laufmittel V.

Wenn das Cyclophosphamid praktisch nicht mehr detektierbar ist, wird die rotbraune Suspension abfiltriert, der Rückstand mit Ether gewaschen und die noch rotbraune Lösung am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 200 ml eingeengt.

Zur weiteren Reinigung wird die Lösung einer Trockensäulenchromatographie entsprechend Abschnitt 2.5. unterworfen. Dazu werden 50 ml mit 30 g Kieselgel am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Entwickelt wird mit EE (Säulendaten: Trennlänge 90 cm, Nylonschlauchfolie der Wandstärke 0,04 mm, flacher Durchmesser 80 mm).

Da 3-t-BOC-cyclophosphamid keine Fluoreszenzabsorption zeigt, muß die Säule entsprechend dem erwarteten R_f-Wert fraktioniert werden (vgl. dazu Abschnitt 3.1.2.3.). Extrahiert werden die Kieselgelfraktionen mit mindestens je 500 ml, die Zusammensetzung der Lösungen mittels DC, Laufmittel V, überprüft. Diejenigen Fraktionen, die ausschließlich 3-t-BOC-cyclophosphamid enthalten, werden vereinigt und das Lösungsmittel abrotiert.

Die restliche Lösung wird auf demgleichen Weg gereinigt.

Das zurückbleibende Öl wird in wenig EE gelöst und PE zugegeben. In der Kälte bei ca. -20°C fällt zunächst wieder das Öl aus. Wiederholt man diesen Vorgang mehrmals, kommt es allmählich zur Bildung eines festen Niederschlags. Da aber die Kristallbildung nur sehr unvollständig blieb, wurde zur Analyse das Öl eingesetzt.

MG: 361,24
Ausbeute: 7,9 g (= 72% d.Th.)

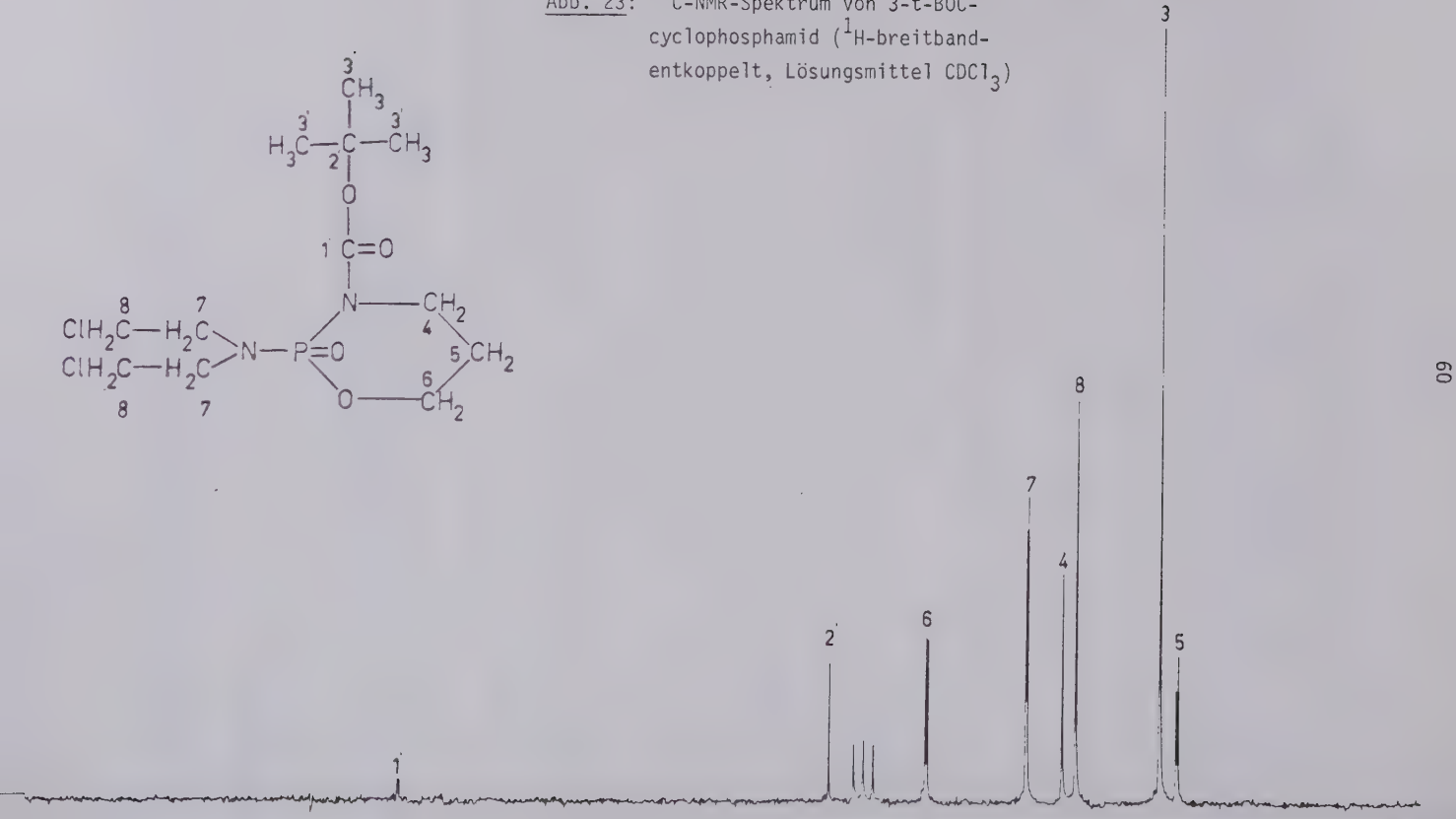
Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel V = 0,29
2. Elementaranalyse:
   ber.: C = 39,90 H = 6,43 N = 7,76 Cl = 19,63
   gef.: C = 39,76 H = 6,37 N = 7,58 Cl = 19,86
3. IR-Daten in cm^{-1}, Öl auf NaCl-Preßling (Abb. 22)
   2980, 2940 (C-H st); 1710, 1700 (C=O st); 1470, 1450, 1445 (CH_2 def); 1280-1240 (P=O st, C-N st, C-O st as); 1160-1130 (P-N-C st ?); 1050 (P-O-C st).
4. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel $CDCl_3$ (Abb. 23)
   25,23 (C-5, J_{cp} 6,87, Triplett); 28,07 (C-3´, Quadruplett); 41,95 (C-8, Triplett); 44,12 (C-4, Triplett); 50,08 (C-7, J_{cp} 4,58, Triplett); 66,53 (C-6, J_{cp} 6,87, Triplett); 82,75 (C-2´, Singlett); 153,49 (C-1´, J_{cp} 5,72, Singlett).

Anmerkungen

Die Darstellung von 3-t-BOC-cyclophosphamid gelang nur dann, wenn das durch metallisches Natrium entstandene Natrium-Salz des Cyclophosphamids unmittelbar mit t-BOC-azid weiterreagieren konnte. Versuche, eine Reaktion mit t-BOC-

Abb. 23: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-t-BOC-cyclophosphamid (^{1}H-breitband-entkoppelt, Lösungsmittel $CDCl_3$)



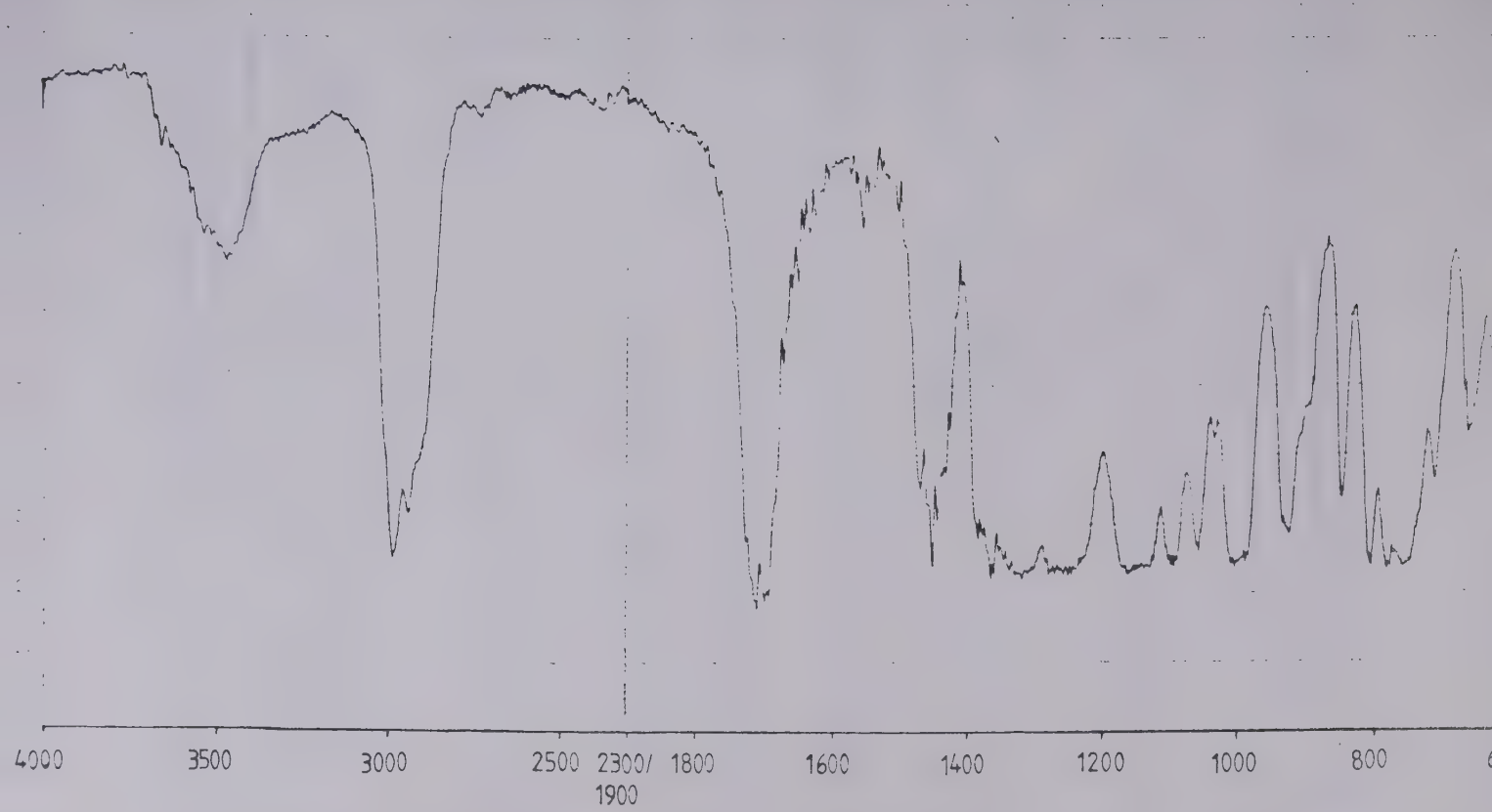


Abb. 22: IR-Spektrum von 3-t-BOC-cyclophosphamid (Öl auf NaCl-Preßling)

azid erst nach vollständiger Salzbildung zu erreichen, schlugen fehl. Zum einen zeigt das Natrium-Salz in aprotischen Lösungsmitteln keine Tendenz, in Lösung zu gehen, zum anderen, in protischen Lösungsmitteln, wo es sich löst, erfolgt die Protonierung schneller als die Reaktion mit t-BOC-azid und es findet ebenfalls keine Umsetzung statt.

Gleichfalls mißlangen Versuche, Cyclophosphamid auf dem für Aminosäuren üblichen Weg zu derivatisieren (Dioxan/Wasser-Gemisch, Reaktion bei konstantem pH-Wert zwischen 10 und 12).

Mit Hilfe der Trockensäulenchromatographie war es möglich, das Produkt von nicht umgesetztem t-BOC-azid und verschiedenen hydrophilen Nebenprodukten abzutrennen. Trotzdem war eine Kristallisation nur bedingt möglich, da noch einige Verunreinigungen vorlagen, die chromatographisch nicht zu separieren waren. Die oben angegebene Ausbeute bezieht sich daher auf das Öl, welches aber zur weiteren Umsetzung genügte.

Die zur Verfügung stehenden Analysendaten zeigen, daß es sich bei der isolierten Verbindung um das postulierte 3-t-BOC-cyclophosphamid handelt.

- Das Signal bei 153,49 ppm des ^{13}C-NMR-Spektrums ist typisch für Carbonylgruppen in Kohlensäurederivaten; eine Bindung an das Cyclophosphamid-Gerüst wird durch die Spin-Spin-Kopplung bewiesen.
- Die aufgrund des am N-3 befindlichen Acyl-Rests erwartete chemische Verschiebung von C-4 nach höheren ppm tritt auf.
- Das IR-Spektrum zeigt die typische C=O Streckschwingung in dem für Kohlensäurederivate üblichen Bereich um 1700 cm^{-1}.

Im Gegensatz zu den sonst erhaltenen IR-Spektren treten hier weniger distinkte Banden auf. Mögliche Ursachen: Absorptionen nicht äquivalenter Bindungen bei vergleichbarer Wellenzahl und Intensität und/oder unspezifische Absorptionen, bedingt durch Verunreinigungen des Öls.

3.5.2. Chlorierung von 3-t-BOC-cyclophosphamid

Zur Chlorierung entsprechend Abschnitt 2.3. werden 0,96 g (= 2,5 mMol) 3-t-BOC-cyclophosphamid in 50 ml Chloroform gelöst.

Ähnlich wie bei anderen Präparationen zeigt sich auch hier das Phänomen, daß es zwar zu einer Reaktion des Chlors kommt, sichtbar an der Bildung von Pyridin Hydrochlorid-Nebeln, eine Umsetzung mit 3-t-BOC-cyclophosphamid allerdings nicht feststellbar ist.

Dieses Bild ändert sich praktisch während des gesamten Verlaufs der Chloreinleitung nicht. Auch wenn das Pyridin vollständig als Hydrochlorid vorliegt, zeigt die DC ausschließlich einen Substanzfleck mit dem R_f der Ausgangsverbindung.

Die Prozedur wurde eingestellt, als auch nach wiederholter Chloreinleitung lediglich Spuren einer NBP pos., UV neg. Substanz mit dem R_f-Wert von ca. 0,44 und etwas Cyclophosphamid (nachgewiesen durch Vergleich in Laufmittel II) neben einem unumgesetzten Hauptteil von 3-t-BOC-cyclophosphamid chromatographisch nachweisbar waren. Ein Reaktionsprodukt war dementsprechend nicht isolierbar.

3.5.3. Umsetzung des Chlorierungsgemischs 3.5.2. mit Thiophenol

Der Reaktionsansatz entspricht Abschnitt 3.5.2., die Umsetzung mit Thiophenol erfolgt gemäß der Vorschrift des Abschnitts 2.4..

Die erhaltenen DC`s parallelisieren fast vollständig die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts. Lediglich die Bildung von Cyclophosphamid erscheint etwas prominenter als im Vergleichsansatz.

3.5.4. Darstellung und Charakterisierung von 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino[2,1-b]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid

Wie in Abschnitt 3.5.1.3. erwähnt, bildet sich neben 3-t-BOC-cyclophosphamid noch eine andere Substanz, die NBP pos., UV neg. ist.

Aufgrund von Voruntersuchungen zur Umsetzung von Cyclophosphamid mit t-BOC-azid war festgestellt worden, daß dieses Produkt allein schon dann entsteht, wenn man Cyclophosphamid mit metallischem Natrium in Ether behandelt. Um dieses Produkt charakterisieren zu können, wurde es daher entsprechend dem folgenden Ansatz hergestellt und isoliert.

5,6 g (= 20 mMol) Cyclophosphamid x H_2O, gelöst in 150 ml Chloroform, getrocknet über $MgSO_4$ werden am Rotationsverdampfer vollkommen eingeengt und das zurückbleibende Öl wird in 100 ml Ether aufgenommen. Man fügt nun unter ständigem Rühren portionsweise frisch geschnittenes metallisches Natrium zu. Die DC zeigt dann neben dem Ausgangsstoff nur noch die gewünschte Substanz. Es wird soviel Natrium zugefügt, daß das gesamte Cyclophosphamid umgesetzt wird (zum größten Teil bildet sich das Na-Salz, welches aus der Lösung ausfällt).

Die Ether-Lösung wird abfiltriert, auf ein Volumen von 50 ml am Rotationsverdampfer eingeengt und die verbleibende Lösung bei ca. -20°C aufbewahrt. Schon bald zeigen sich ausgefallene Kristalle, die erneut aus Ether umkristallisiert werden (man löst in einer größeren Menge Ether bei Raumtemperatur, engt ein und läßt wieder bei -20°C auskristallisieren).

MG: 224,7
Ausbeute: 490 mg (= 11% d.Th.)

Analytik

1. R_f-Wert in Laufmittel II = 0,57
2. Fp.: 72-74°C
3. Elementaranalyse:
   ber.: C = 37,42 H = 6,29 N = 12,47 Cl = 15,78
   gef.: C = 37,67 H = 6,24 N = 12,36 Cl = 16,04
4. IR-Daten in cm^{-1}, KBr-disk (Abb. 24)
   2970, 2890, 2850 (C-H st); 1480, 1465 (CH_2 def); 1240 (P=O st); 1130 (P-N-C st); 1045 (P-O-C st).
5. ^{13}C-NMR-Daten in ppm rel. TMS, Kopplungskonstanten in Hz, Signalaufspaltungen ermittelt nach Anwendung der off-resonance-Technik, Lösungsmittel deuteriertes Aceton (Abb. 25)
   21,73 (C-6, J_{cp} 6,87, Triplett); 43,70 (C-5, J_{cp} 3,43, Triplett); 44,69 (C-11, Triplett); 44,92 (C-3, J_{cp} 9,15, Signalaufspaltung nicht bestimmbar); 46,42 (C-2, J_{cp} 14,86, Signalaufspaltung nicht bestimmbar); 48,73 (C-10, J_{cp} 4,58, Triplett); 66,43 (C-7, J_{cp} 5,72, Triplett).
6. FD-Massenspektrum, Daten in m/e, 0-10 mA ehc (Abb. 26)
   224 (= Molekularmassenpeak $M^{+\cdot}$); 206 (= $M^{+\cdot} - H_2O$).

Anmerkungen

Diese bicyclische Verbindung ist, wie aus der Herstellungsbeschreibung bereits hervorgeht, problemlos darzustellen. Auffällig ist allerdings, daß die eintretende Dehydrohalogenierung nur einen Bruchteil des Gesamtumsatzes ausmacht (der Hauptteil besteht aus dem Natrium-Salz des Cyclophosphamids). Daß die Verbindung nicht schon bei Raumtemperatur ausfällt und dadurch die Ausbeute mindert, konnte nachgewiesen werden, indem der Niederschlag des Reaktionsansatzes in EtOH gelöst wurde (worin das Produkt stabil ist), außer Cyclophosphamid jedoch nichts nachweisbar war.

Die postulierte Struktur wird durch folgende Daten gestützt:

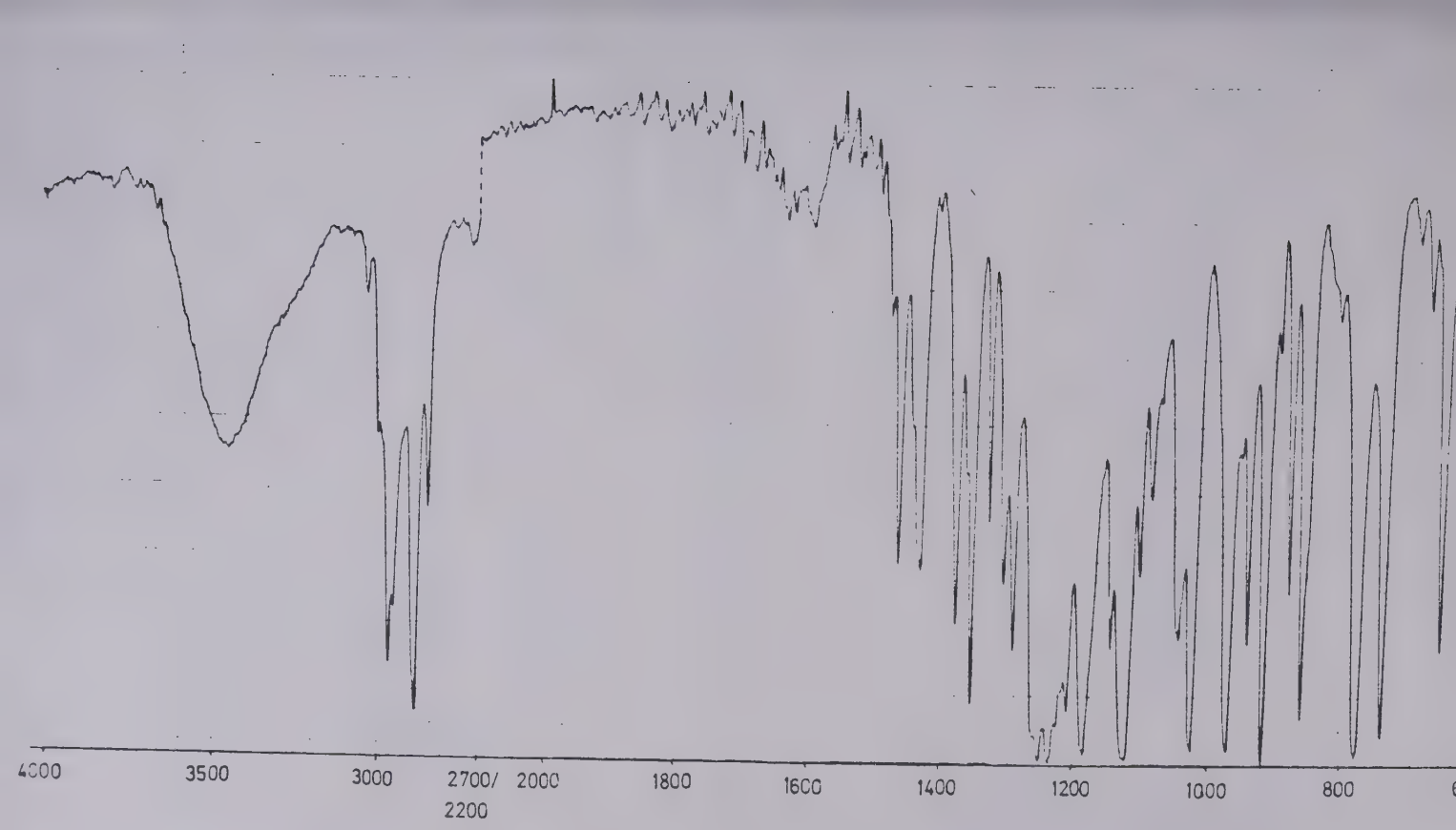


Abb. 24: IR-Spektrum von 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino [2,1-b]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid (KBr-disk)

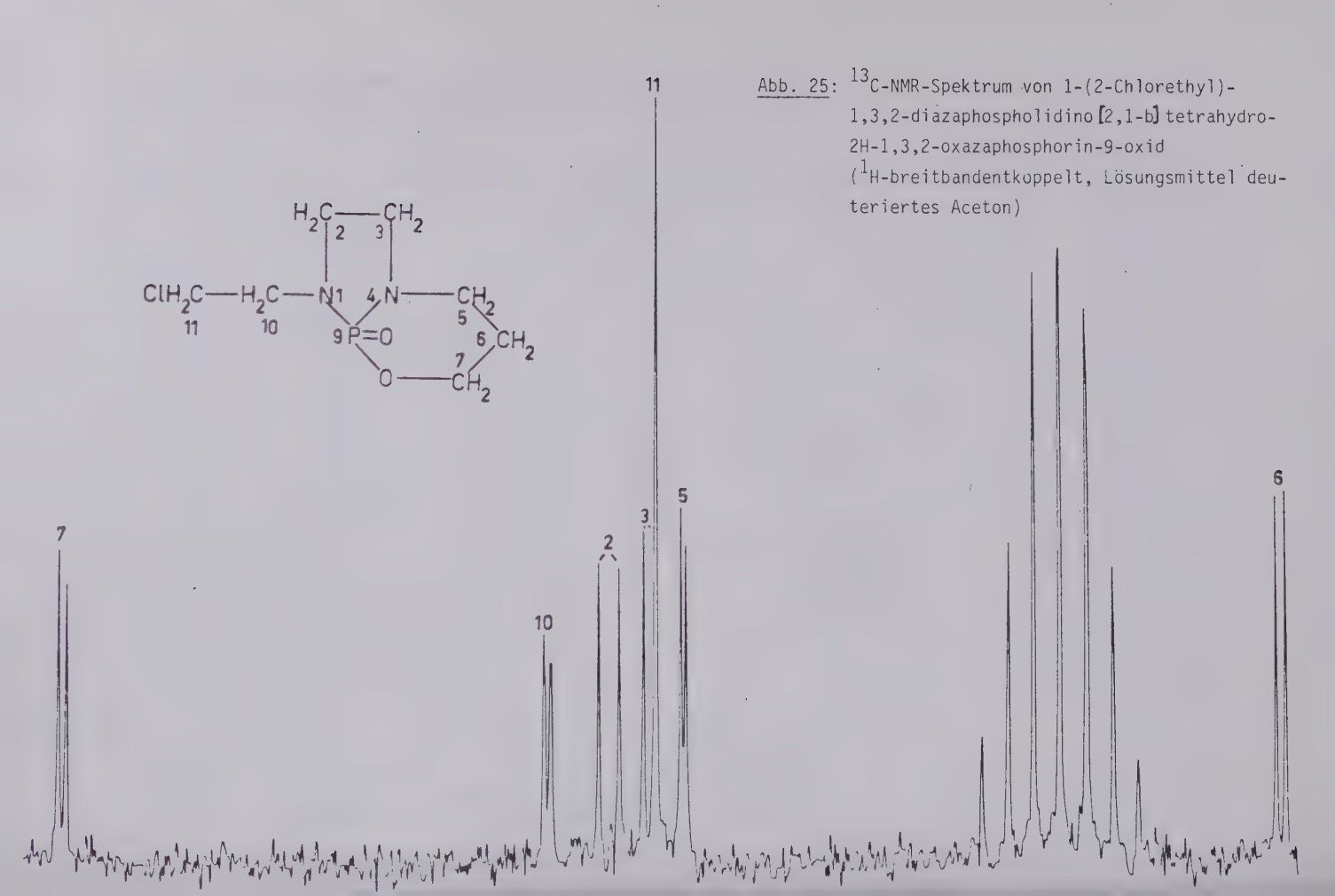


Abb. 25: ^{13}C-NMR-Spektrum von 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino[2,1-b]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid (^{1}H-breitbandentkoppelt, Lösungsmittel deuteriertes Aceton)

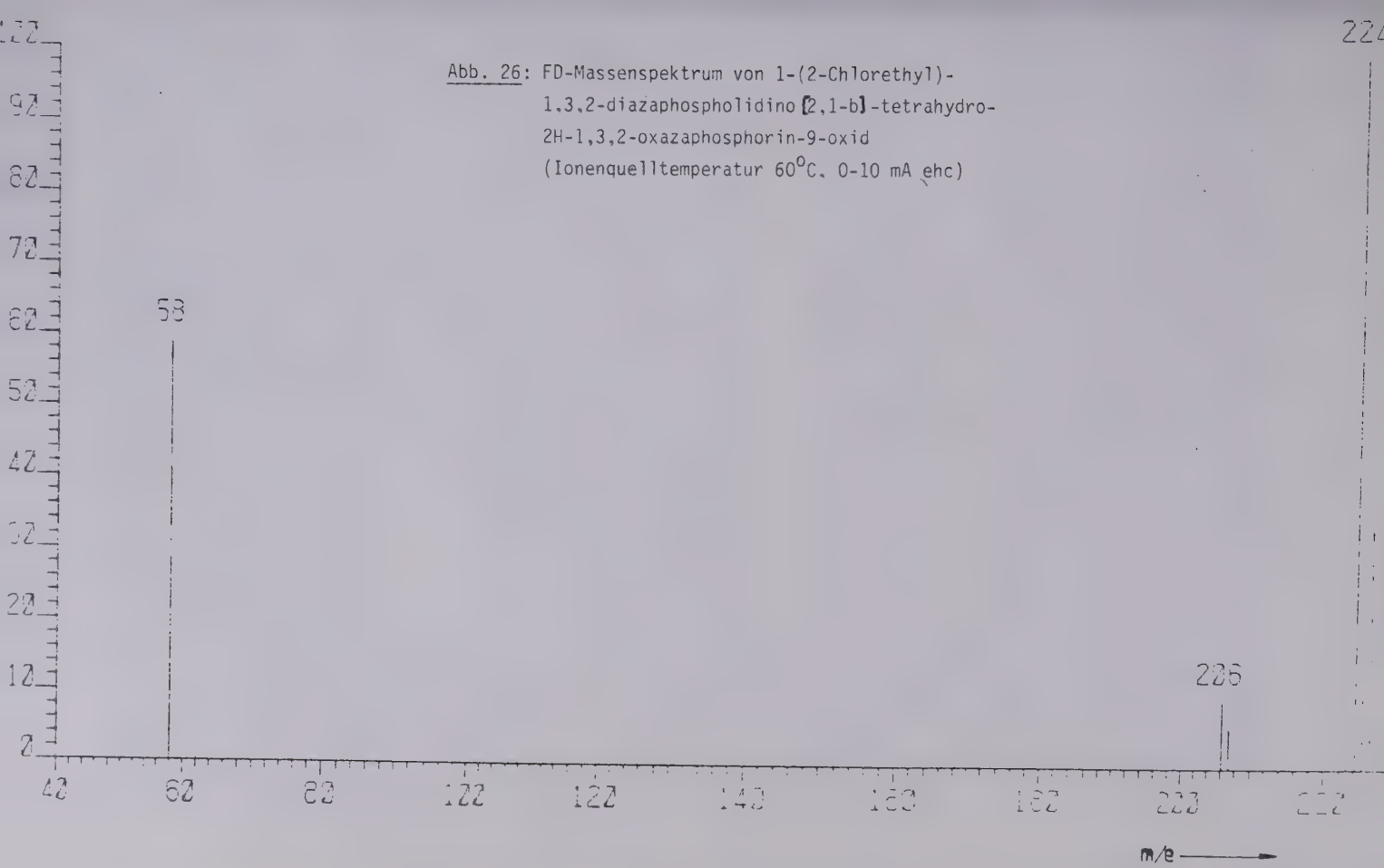


Abb. 26: FD-Massenspektrum von 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino [2,1-b]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid (Ionenquelltemperatur 60°C, 0-10 mA ehc)

- im FD-Massenspektrum tritt entsprechend der Molekularmasse ein peak m/e = 224 mit typischem Isotopenmuster für ein Cl-Atom auf. Das Zersetzungsprodukt der Masse m/e = 206 ist ein Hinweis auf den Lactoncharakter der Verbindung;
- im IR-Spektrum ist keine N-H Streckschwingung feststellbar, die C-H Valenzschwingungen sind sehr intensiv;
- die Signallagen der C-Atome 5, 6, 7, 10 und 11 entsprechen in etwa den vergleichbaren C-Atomen der Ausgangssubstanz, die Daten für C-2 und C-3 sind in Übereinstimmung mit den theoretisch zu erwartenden chemischen Verschiebungen.

Zunächst war nicht sicher, ob die gemessenen Signalaufspaltungen im ^{1}H-breitbandentkoppelten ^{13}C-NMR-Spektrum auf Spin-Spin-Kopplungen zurückzuführen sind oder es sich um verschiedene C-Atome handelt. Aufgrund dessen, daß die gemessenen Signalintegrale jedoch nur dann vergleichbar sind, wenn angenommen wird, daß es sich um jeweils nur 1 C-Atom handelt, wurde die alternative Annahme verworfen.

Die Interpretation wurde noch dadurch erschwert, daß die Lage des Signals für C-11 mit der für C-3 (Vergleich der Integrale!) zusammenfällt.

Das off-resonance-Spektrum konnte keine zusätzlichen Informationen liefern, da im interessierenden Bereich die Signale nicht einzeln aufgelöst werden.

In der Verbindung sollte zusätzlich zum Phosphor N-4 ein weiteres chirales Element sein, da hier die Substituenten durch die Ringverknüpfung in ihrer Position relativ zum Stickstoff festgelegt sind. Aufgrund von Modellbetrachtungen sollte es sich um einen Racemat der folgenden Konfiguration handeln: P(R)/N-4(R) bzw. P(S)/N-4(S). Die Bildung des anderen Enantiomerenpaares ist auszuschließen.

ZON et al. synthetisierten diese, im Zusammenhang mit der nichtenzymatischen Hydrolyse von Cyclophosphamid als erstes Zwischenprodukt postulierte Verbindung, indem sie Cyclophosphamid mit Natriumhydrid in Ether behandelten (54). Die damit erhaltenen Daten lassen sich jedoch nur bedingt mit denjenigen meines Syntheseprodukts vergleichen, da anzunehmen ist, daß deren Produkt weniger einheitlich war (keinerlei Bildung von Kristallen, keine einheitliche Elementaranalyse). Auf eine vergleichende Diskussion wird daher verzichtet.

STEC et al. (74) stellten diese Verbindung auf demselben Weg dar und erhielten ein kristallines Produkt, welches in der Elementaranalyse und im ^{31}P-

NMR-Spektrum einheitlich war. Von den angegebenen Daten sind der Schmelzpunkt (75-79^{o}C) und der im EI-Massenspektrogramm erhaltene Molekularmassenpeak (m/e = 224, rel. Intensität = 8%) mit den von mir gemessenen Werten vergleichbar. Leider wurden keine Angaben zur ^{13}C-NMR- und IR-Analyse gemacht.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER SYNTHESEN

4.1. Analysenverfahren

Die Strukturaufklärung bzw. Verifizierung einer postulierten Struktur wurde insbesondere mit Hilfe von ^{13}C-NMR, IR und FD-MS vorgenommen. Für die Auswahl der Verfahren waren vor allem folgende Gründe ausschlaggebend:

- ^{13}C-NMR liefert Informationen über die minimale Anzahl der am Molekülaufbau beteiligten C-Atome, deren chemische "Umgebung" (^{1}H-breitbandentkoppelte Spektren) und die Anzahl der am C-Atom gebundenen Protonen (off-resonance-Spektren). Zusätzliche Informationen wurden in diesem Fall auch durch die beobachtbare Spin-Kopplung zwischen Kohlenstoff und Phosphor erhalten;
- IR-Daten geben Aufschluß über bestimmte funktionelle Gruppen, insbesondere, die hier bearbeiteten Verbindungen betreffend, über das Vorliegen von N-H Valenzschwingungen;
- FD-Massenspektren sind aufgrund des rel. hohen Festpunktes der untersuchten Verbindungen am besten geeignet, sowohl das Molekulargewicht zu bestimmen als auch durch spezifische Fragmentierung Aufschluß über den Molekülaufbau zu erhalten (55,56).

4.2. Methodik der Chlorierung

4.2.1. Chlorierungsmittel

Es war zu erwarten, daß die gewünschte Substitution von Wasserstoff durch Chlor in Position 4 des Cyclophosphamid-Gerüsts einem Radikalmechanismus folgt. Als Chlorierungsmittel kommt somit dem elementaren Chlor die größte Bedeutung zu. Im Vergleich zu organischen N-Chlorverbindungen und zahlreichen Derivaten der unterchlorigen Säure (Verbindungen mit positiv induziertem Chlor) liegt der große Vorteil in einer relativ problemlosen Behandlung des während der Reaktion anfallenden Chlorwasserstoffs als im wesentlichen einzigen unmittelbaren Produkt der Reaktionskette

$$Cl_2 \xrightarrow{\text{Start}} 2\ Cl^{\bullet}$$

$$Cl^{\bullet} + RH \longrightarrow R^{\bullet} + HCl$$

$$R^{\bullet} + Cl_2 \longrightarrow R\text{-}Cl + Cl^{\bullet}$$

Das zunächst verwendete Chlor war allerdings nicht geeignet, da es größere

Mengen Chlorwasserstoff enthielt. Im Gegensatz dazu war das von der Fa. Messer-Griesheim bezogene 99,99%ige Chlor unmittelbar ohne weitere Reinigung und Trocknung geeignet.

Da mit vergleichbar geringen Mengen Chlor gearbeitet wurde, konnte auf die Vernichtung überschüssigen Chlors verzichtet werden.

4.2.2. Bindung des Chlorwasserstoffs

Der während der Reaktion anfallende Chlorwasserstoff muß aufgrund der unter den Reaktionsbedingungen rasch verlaufenden Zersetzung von Cyclophosphamid und seinen Derivaten sofort abgefangen werden.

Hierfür kommen z.B. Na-Acetat, $CaCO_3$, Pyridin und TEA in Frage. Als gut geeignet hat sich hier durchweg das Pyridin erwiesen, da es in dem als Lösungsmittel verwendeten Chloroform gut löslich ist und eine hohe Reaktivität zeigt. Dss nach den üblichen Methoden destillierte Pyridin hat einen zu hohen Gehalt an Wasser; es wurde daher ausschließlich trockenes Pyridin (Wassergehalt max. 0,01%) eingesetzt.

Die Wasserempfindlichkeit der zu chlorierenden Verbindungen konnte leicht durch Verwendung von $CaCO_3$ als HCl-Fänger demonstriert werden; das dabei gebildete Kohlensäuregas zerfällt unmittelbar in Wasser und CO_2 und inhibiert so die gewünschte Chlorierungsreaktion.

4.2.3. Lösungsmittel

Die Chlorierung wurde ausschließlich in Lösung durchgeführt, da nur so der Reaktionsablauf genügend kontrolliert werden konnte. Als Lösungsmittel erwies sich Chloroform p.a. als geeignet, da es relativ inert ist gegen Chlor, über gute Lösungseigenschaften sowohl für Chlor als auch für die zu chlorierenden Verbindungen verfügt, einen niedrigeren Kochpunkt hat als der ebenfalls untersuchte Tetrachlorkohlenstoff und somit leicht am Rotationsverdampfer abziehbar ist.

4.2.4. Radikalbildung

Zum Start und zur Aufrechterhaltung der Radikalreaktion wurde unter Rückfluß (Badtemperatur ca. 100°C), mit Belichtung durch sichtbares Licht und mit einem Radikalstarter, dem Dibenzoylperoxid, gearbeitet.

Auf die Anwendung von UV-Strahlung, was u.U. eine Zersetzung der Chlor-Derivate zur Folge haben kann, wurde verzichtet.

Durch das Arbeiten mit siedendem Chloroform wurde auch die sonst störende Inhibierung durch Sauerstoff erheblich herabgesetzt.

4.3. Cyclophosphamid

4.3.1. Chlorierung

Die Chlorierung von Cyclophosphamid mit freier NH-Gruppierung führte zunächst zu dem erwarteten ersten Chlorierungsprodukt 3-Chlor-cyclophosphamid (Abschnitt 3.1.2.1.) entsprechend der am N-3 relativ hohen Elektronendichte. Die Frage, inwieweit es sich hier um eine radikalisch verlaufende Reaktion handelt, kann jedoch nicht eindeutig beantwortet werden. Möglicherweise ist der Reaktionsmechanismus von den jeweiligen Reaktionsbedingungen abhängig. Es ist nämlich durchaus möglich, 3-Chlor-cyclophosphamid auch auf einem anderen Weg darzustellen, der eine andere Bildungsweise favorisiert.

Tropft man eine Lösung von Cyclophosphamid in Chloroform zu einer auf -15°C vorgekühlten äquimolaren Chlor-in-Chloroform-Lösung (mit oder ohne Pyridin als HCl-Fänger), so bildet sich ebenfalls 3-Chlor-cyclophosphamid. Diese Reaktion spricht daher mehr für eine Heterolyse des Chlors, vergleichbar mit der Bildung von HOCl und HCl bei Einleitung von Chlor in Wasser.

Der Versuch, 3-Chlor-cyclophosphamid zu 3,4-Dehydro-cyclophosphamid zu dehydrohalogenieren (Abschnitt 3.1.2.2.) führte zu keinem positiven Ergebnis; d.h. trotz Anwendung verschiedener Verfahren gelang es nicht, Bedingungen zu finden, die eine Abstraktion des Chlors von N-3 ohne Rekonstitution von Cyclophosphamid ermöglichen. Offenbar wirkt hier die P=O Gruppe mit ihrem negativen induktiven Effekt dem entgegen, indem Elektronen vom Chlor abgezogen werden, sodaß ausschließlich positiviertes Chlor abdissoziieren kann.

Die über die Bildung von 3-Chlor-cyclophosphamid hinausgehende Chloreinleitung konnte leider nicht klären, inwieweit eine Zweitchlorierung am Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Gerüst möglich ist. Das einzig isolierbare Produkt war nicht charakterisierbar (vgl. Abschnitt 3.1.2.3.); insbesondere konnte nicht die interessierende Substitution an N-3/C-4 abgeklärt werden. Nachweisbar war allerdings, daß es sich nicht um 3,4-Dichlor-cyclophosphamid handelt. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund liegt vielleicht in der verminderten Reaktivität von C-4 aufgrund des zusätzlich ins Cyclophosphamid-Molekül eingeführten Chlors in 3-Position, wodurch die Elektronendichte noch geringer wird.

4.3.2. Umsetzung mit Thiophenol

Die Umsetzung des Reaktionsansatzes 3.1.2. (Chlorierung von Cyclophosphamid) mit Thiophenol (Abschnitt 3.1.3. bzw. 3.1.3.1.) zeigte, daß auch ohne Detektion bzw. Isolierbarkeit entsprechender Chlorierungsprodukte eine Synthese von 4-(S-R)-Mercapto-Derivaten von Cyclophosphamid möglich ist.

Die Bildungsweise von 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid ist nicht bekannt. Zwei Möglichkeiten sind bevorzugt denkbar:

- unter den gewählten Reaktionsbedingungen kommt es zu einer Dehydrohalogenierung mit Bildung von 3,4-Dehydro-cyclophosphamid mit anschließender Addition von Thiophenol und dem Ethylrest, der wahrscheinlich aus der Seitenkette, der Bis-(2-chlorethyl)amino-Gruppe, eines anderen Cyclophosphamid-Moleküls stammt (N-Alkylierung nach vorheriger Cl-Abspaltung);
- die Bildung von 3-Ethyl-cyclophosphamid ermöglicht über den positiv induktiven Effekt eine Chlorierung in 4-Position mit anschließender Substitution des Chlors durch Thiophenol.

Eine gezielte Synthese ist demnach nur nach vorheriger (reversibler) Maskierung der N-3 Funktion möglich.

4.4. N-3 geschützte Cyclophosphamid-Derivate

4.4.1. Schutzgruppen

Reine Alkylschutzgruppen sind leider zum reversiblen Schutz des Amidstickstoffs nicht geeignet, da sie eine irreversible Maskierung bedeuten (50). Es wurden zunächst nur solche Schutzgruppen in die Überlegungen einbezogen, die in der Peptidchemie zur Maskierung der Peptid-Bindung verwendet werden.

Diese Gruppen werden dann eingesetzt, wenn es gilt, sog. "backbone-Acylierungen" zu verhindern. Hierbei handelt es sich um Acylierungen der bereits gebildeten Peptidkette wegen geringer Reaktivität der terminalen Aminogruppe und dadurch bedingtem hohen Überschuß an reaktiver Carboxyl-Komponente.

Solche Schutzgruppen sind die Benzyl- (50,57,59) und 2,4-Dimethoxybenzyl-Gruppe (57,58). Die Abspaltung einer BenzylGruppe von der Peptidbindung gelingt mit Natrium in flüssigem Ammoniak; dagegen kann die 2,4-Dimethoxybenzyl-Gruppe schon durch Trifluoressigsäure bei 20°C glatt abgespalten werden. Die Einführung der Schutzgruppe gelang entsprechend der für Aminosäuren gegebenen Vorschrift (50), indem das Kondensationsprodukt (Schiff´sche Base), gebildet aus äquimolaren Mengen von 3-Aminopropanol-(1) und Benzalde-

hyd bzw. 2,4-Dimethoxybenzaldehyd mittels $NaBH_4$ zum sekundären Aminoalkohol reduzeirt wird. Im Gegensatz zur reduktiven Methylierung mit Formaldehyd ist die Gefahr der Bildung eines tertiären Aminoalkohols bzw. Acetalisierung ge ring.

Die Umsetzung des Reaktionsgemischs der Chlorierung von Cyclophosphamid mit Thiophenol hatte u.a. ergeben, daß in geringem Ausmaß 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid gebildet worden war.

Die 2-Nitrophenylsulfenyl-Gruppe ist bereits seit einiger Zeit bekannt (60). Entsprechend den Ergebnissen von WÜNSCH und DREES (61) gelingt in hoher Ausbeute die unmittelbare Acylierung von Peptiden mit Hilfe von 2-Nitrophenylsulfenyl-chlorid.

Wie eigene Untersuchungen zeigten (vgl. Abschnitt 3.4.1.3.), läßt sich auch der Phenylsulfenyl-Rest gut über Phenylsulfenyl-chlorid einführen. Die Abspaltung war möglich durch Trifluoressigsäure (62) und HBr in Eisessig (63), ohne daß wesentliche Nebenreaktionen beobachtbar waren.

Die Einführung weiterer Schutzgruppen in das Cyclophosphamid-Molekül erwies sich zunächst als unmöglich, da die Acidität des Amidstickstoffs N-3 und damit die Verfügbarmachung eines freien Elektronenpaars unzureichend ist, sodaß die in der Literatur beschriebenen Methoden nicht anwendbar waren.

Im Zusammenhang mit der Derivatisierung von Lactamen wurde jedoch erfolgreich der Versuch unternommen, eine Salzbildung nach Umsetzung mit Natrium in einem indifferenten Lösungsmittel zu erreichen, wodurch die Nucleophilie derart gesteigert werden konnte, daß eine Aclierung möglich war (64).

Entsprechend wurde für Cyclophosphamid verfahren, wobei aber deutlich wurde, daß

- eine Derivatisierung nur möglich ist, wenn Salzbildung und nucleophiler Angriff gleichzeitig stattfinden können (s. Abschnitt 3.5.1.3.);
- das gebildete Derivat nicht durch den während der Reaktion entwickelten nascierenden Wasserstoff wieder hydrogenolytisch gespalten wird (z.B. gelang die Einführung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe (65) nur unzureichend, da diese Schutzgruppe leicht durch katalytische Hydrierung abspaltbar ist (66,67).

Als wichtigster Vertreter der acidolytisch abspaltbaren Schutzgruppen wurde daher der tert.-Butyloxycarbonyl-Rest (BOC) (68) eingesetzt, welcher in Form

des üblicherweise verwendeten t-BOC-azid einen genügend großen Umsatz zeigte. Allerdings neigt die Verbindung 3-t-BOC-cyclophosphamid unter den zur Abspaltung notwendigen Reaktionsbedingungen (HBr/Eisessig oder HCl/Eisessig (68,69) bzw. Trifluoressigsäure (70,71)) zu Nebenreaktionen (Bildung von nicht näher untersuchten Verbindungen neben dem Hauptprodukt Cyclophosphamid).

4.4.2. Chlorierung

4.4.2.1. 3-Benzyl-cyclophosphamid

Der Benzylrest an N-3 ist nicht geeignet, eine Chlorsubstitution an C-4 zu erzielen. Obwohl eindeutig eine Chloraufnahme erfolgt, ist eine Veränderung in der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zunächst nicht festzustellen (Abschnitt 3.2.2.).

Diese Beobachtung wurde auch bei der Chlorierung von Cyclophosphamid bzw. den anderen Cyclophosphamid-Derivaten gemacht. Es bieten sich zwei Möglichkeiten der Interpretation an:

- es kommt zur Bildung des 4-Chlor-Derivats, dessen Stabilität ist jedoch so gering, daß es entweder bereits im Reaktionsgemisch oder während der DC zerfällt;
- es bildet sich eine Additionsverbindung Pyridin x Cl_2, entsprechend der für Brom bereits bekannten Verbindung Pyridin x Br_2, welche im übrigen dazu befähigt ist, Brom abzugeben (Bromierungsmittel) bzw. HCl oder HBr anzulagern (72,73).

Die zweite Vermutung ist allerdings in Anbetracht dessen, daß die Detektierbarkeit von Pyridin oder ähnlichen Verbindungen im Verlauf der Reaktion immer mehr abnimmt und damit ein "Verbrauch" dieser Verbindungen festzustellen ist, eher als unzutreffend für die gemachten Beobachtungen zu bezeichnen.

4.4.2.2. 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid

Die Schutzgruppe wird schon sehr bald gespalten und es entsteht in rel. großem Ausmaß 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid. Die zunächst etwas ungewöhnlich erscheinende Bildung der Verbindung wird verständlich, wenn man überlegt, daß bilanzmäßig Phenol ein weiteres Produkt darstellen könnte.

Das im Verlauf der Chlorierung später auftretende Produkt konnte nicht isoliert werden. Daß es sich hier um ein Chlorierungsprodukt handelt, ist jedoch auszuschließen, da diese Verbindung auch ohne Chloreinwirkung nach

längerem Stehen bei Raumtemperatur, gelöst in EE, als ein Folgeprodukt von 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid entsteht (vgl. auch Abschnitt 3.3.2.).

4.4.2.3. 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid

Die Chlorierung von 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid führte zur Isolierung eines Produkts, dessen Charakterisierung war jedoch nur unzureichend möglich (s. Abschnitt 3.4.2.1.). Eine Chlorierung in C-4 Position ist aber eindeutig auszuschließen.

Die Schutzgruppe ist unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil, sondern wird in zunehmendem Maße abgespalten unter Bildung von Cyclophosphamid als Hauptkomponente, welches z.T. bei wiederholter Chloreinleitung zu 3-Chlorcyclophosphamid derivatisiert wird.

Inwieweit intermediär eine Bildung der gewünschten Verbindung auftritt, läßt sich vom Reaktionsverlauf her nicht beurteilen.

4.4.2.4. 3-t-BOC-cyclophosphamid

Im Vergleich zu den übrigen Schutzgruppen ist die t-BOC-Gruppe nicht nur resistent gegenüber der Einwirkung von Chlor, sondern auch 3-t-BOC-cyclophosphamid wird in keiner Weise angegriffen. Trotzdem ist auch hier ein Verbrauch an Pyridin festzustellen, sodaß die für 3-Benzyl-cyclophosphamid gemachten Überlegungen auch für diese Verbindung angestellt werden können.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß trotz des sehr unterschiedlichen elektronischen Einflusses der N-3-Substituenten (induktiver Effekt) die Bildung eines stabilen und isolierbaren 4-Chlor-Derivats nicht nachgewiesen werden konnte.

4.4.3. Umsetzung mit Thiophenol

Die Chlorierungsgemische sämtlicher N-3 maskierter Cyclophosphamid-Derivate waren nicht mit Thiophenol umsetzbar.

Mogliche Erklärungen finden sich zum einen in dem Verhalten der Verbindungen gegenüber Chloreinwirkung (vgl. Abschnitt 4.4.2), zum anderen ist eine sterische Hinderung denkbar, sodaß mit einem anderen Mercaptan u.U. eine Reaktion stattgefunden haben könnte.

Eine dahingehende Überprüfung fand nicht statt, da eine Substitution nur mit solchen Thiolen von Interesse ist, die ihrerseits, an C-4 gebunden, den Zutritt hydrolytisch wirksamer Agentien behindern und damit die Bildung von 4-Hydroxycyclophosphamid bzw. Aldophosphamid (vgl. Abb. 1) verlangsamen.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER BIOLOGISCHEN TESTS

5.1. Methodik

Ziel der biologischen Tests war es, Anhaltspunkte dafür zu finden, inwieweit die synthetisierten Verbindungen eine mit Cyclophosphamid vergleichbare oder günstigere Wirksamkeit besitzen.

Im folgenden sollen die Gründe für die Vorgehensweise dargelegt und auf dem Hintergrund der in der Literatur angewandten Verfahren diskutiert werden.

5.1.1. Auswahl des Tumormodells

Cyclophosphamid und Analoga wurden bereits umfangreichen tierexperimentellen Tests unterzogen, wobei verschiedene Tierarten und Tumore zur Anwendung gelangten (75,76). Als besonders sensitiv stellten sich dabei Tumore lymphatischen Ursprungs heraus, z.B. Maus-Leukämie P 388 und L 1210, sodaß diese in zunehmendem Maße zum prescreening bzw. screening Verwendung finden (46,77); daneben werden aber nach wie vor noch verschiedene Experimentaltumoren benutzt, z.B. Yoshida Ascites Tumor AH 13 der Ratte (31) oder Ehrlich Ascites Tumor der Maus (76). Die Vielzahl der verwendeten Tiermodelle erschwert naturgemäß den Vergleich, da die damit erhaltenen Ergebnisse stark variieren bzw. gegensätzliche Aussagen liefern.

In unserem Institut wird seit mehrerern Jahren das Ehrlich-Ascites-Tumor-Carcinom (EATC) der Maus verwendet, welches an den Stamm NMRI durch zahlreiche Passagen adaptiert ist. Dieses Tiermodell zeichnet sich nicht gerade durch hohe Sensitivität gegenüber cyclischen Phosphamidestern aus; es liegt aber Datenmaterial vor (76), welches es gestattet, die von mir synthetisierten Analoga im Vergleich zu Cyclophosphamid zu testen.

5.1.2. Injektionslösungen

Die Injektion nicht wasserlöslicher Substanzen stellt ein besonders gravierendes Problem dar. Leider gibt es keine vergleichenden Untersuchungen über die Verträglichkeit einzelner Lösungsmittel oder Lösungsmittelkombinationen bzw. deren Effekt auf die Wirksamkeit der applizierten Substanz.

In der Literatur werden diese Schwierigkeiten oft durch bloße Auslassung, unzureichende Angaben oder Angabe verschiedener, sehr unterschiedlich zusammengesetzter Lösungsmittel deutlich.

In dieser Arbeit wurde zumeist mit einer 10%igen (v/v) Ethanol in 0,9%iger NaCl-Lösung gearbeitet. Die Injektionslösungen wurden folgendermaßen hergestellt: die Substanz wird in Ethanol gelöst und die Lösung anschließend durch sukzessives Verdünnen mit physiologischer NaCl-Lösung auf 10% eingestellt.

In einigen Fällen war es allerdings unmöglich, die geforderte Menge Substanz in Lösung zu bringen, sodaß zusätzlich mit dem Emulgator Tween 80 gearbeitet wurde. Vorgehensweise: die Substanz wird in Ethanol und einer der Endkonzentration von 1% (v/v) entsprechenden Menge Tween 80 gelöst und langsam mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf das Endvolumen verdünnt. Um die Emulsion zu stabilisieren, wurde zusätzlich 5 Min. mit Ultraschall behandelt.

Die Verträglichkeiten der Lösungsmittel wurden entsprechend dem Behandlungsschema (s. Abschnitt 2.6.) im Vergleich zu 0,9%iger NaCl-Lösung allein an tumortragenden Tieren getestet. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden. Zur möglichen Reaktion zwischen Lösungsmittel und zu applizierender Substanz siehe Abschnitt 5.3.1..

5.1.3. Versuchsaufbau und Kriterien der Wirksamkeit

Nach BROCK (75) werden potentielle Cytostatika in der gleichen Weise auf Wirksamkeit geprüft wie andere mögliche Arzneimittel.

Dazu gehört die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven und die Berechnung des therapeutischen Index DL 5/DC 95. Kriterium für die curative Wirkung ist die endgültige Heilung nach einer Beobachtungszeit von 90 Tagen. Die Substanzen werden entweder 1-2 h nach Implantation bzw. Inokulation des Tumors (Simultanversuch) oder 1 bis mehrere Tage danach (echter Therapieversuch) appliziert. Als Applikationsfrequenz wird entweder eine einmalige Gabe der Gesamtdosis oder fraktionierte Gabe der Gesamtdosis über mehrere Tage verteilt (Prüfung auf kumulative Eigenschaften) empfohlen.

Derartig durchgeführte Tests sind jedoch für prescreening-Versuche, die lediglich der Abschätzung der Wirksamkeit einer Substanz dienen, zu aufwendig, insbesondere, was den Verbrauch an Tieren anbelangt (bei entsprechender Versuchsanordnung beläuft sich die zur Wirksamkeitsprüfung der in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen benötigte Anzahl von Tieren auf ca. 650).

Die vom National Cancer Institute (NCI) der USA entwickelten Verfahren (78)

berücksichtigen diese Tatsache, indem weniger die Dosisabhängigkeit der Wirksamkeit eines Cyclophosphamid-Derivats als seine Wirksamkeit in Relation zu Cyclophosphamid als positivem Standard gemessen wird. Kriterium ist hier nicht die endgültige Heilung, sondern z.B. die erhöhte Überlebenszeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (ILS%). Nur Substanzen, die in diesen Tests Cyclophosphamid vergleichbare Resultate liefern, werden anschließend aufwendigeren und aussagekräftigeren Tests unterworfen.

Problematisch ist der Beginn und die Häufigkeit der Applikation. Einige Beispiele aus der Literatur sollen dies verdeutlichen. SGIURA et al. (76) beginnen 1 Tag nach Inokulation mit der Behandlung, die sie über 7 Tage durch tägliche Gabe der gleichen Dosis fortsetzen; LANE (79) beginnt am 7. Tag nach Inokulation (d.h. ca. 2 Tage vor dem erwarteten Tod einzelner unbehandelter Kontrolltiere) und appliziert danach im wöchentlichen Abstand; ZON et al. (46) applizieren eine Einzeldosis entweder am 1., 2. oder 5. Tag nach Tumorübertragung.

Applikationsart ist meist i.v., i.p. oder p.o., im Fall von Ascites-Tumoren wird meist i.p. Injektion bevorzugt.

Das in dieser Arbeit angewandte Behandlungsschema orientiert sich an dem Verfahren des NCI. Da z.T. nur wenig Substanz zur Verfügung stand und eine weitere Herstellung nur nach entsprechenden Testergebnissen sinnvoll erschien, wurden die Cyclophosphamid-Derivate zunächst bei einmaliger i.p. Injektion 3 Tage nach Inokulation der Tumorzellen in äquimolaren Dosen zu einer Dosis von 100 mg/kg Cyclophosphamid getestet (als maximal tolerierbare Dosis geben SUGIURA et al. (76) 125 mg/kg an). Lediglich die bicyclische Verbindung 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino- 2,1-b tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid wurde, entsprechend den Literaturangaben (77) in einer Dosierung von 500 mg/kg getestet. Der Applikationszeitpunkt von 3 Tagen wurde gewählt, da dann der Tumor genügend ausgeprägt ist (echter Therapieversuch), zum anderen jedoch der Abstand zu dem erwarteten Beginn der ersten Todesfälle unbehandelter Kontrolltiere groß genung ist.

Die Ergebnisse der Prüfung von 3-Chlor-cyclophosphamid legten nahe, die Wirkung im Rahmen eines zweiten Experiments zu untersuchen. Hier wurde die Gesamtdosis über mehrere Tage verteilt bereits 1 Tag nach Inokulation mit der Behandlung begonnen, da sonst, aufgrund der in wenigen Tagen zum Tode führenden Ascites-Form,damit zu rechnen war, daß einige Tiere vor Behandlungsende starben.

5.2. Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in den Tabellen I und II zusammengefaßt.

5.2.1. Cyclophosphamid x H_2O

Entsprechend der geringen Sensitivität des Tumors erhält man bei einmaliger Dosierung lediglich eine gerinfügig erhöhte Überlebensrate (ILS = 26%) im Vergleich zu ZON et al. (46), die, unter Verwendung von L 1210 ILS-Werte von 62,5 , 87 bzw. 49,3% (je nach Versuchsanordnung) erhielten.

Allerdings erscheint eine höhere Dosierung fragwürdig, da die Tiere durchschnittlich weniger Ascites als die Kontrolltiere gebildet hatten, die Mortalität also weniger auf den Tumor als auf eine zu hohe Allgemeintoxizität zurückzuführen ist.

Bei Verteilung der Gesamtdosis über mehrere Tage entsprechend Behandlungsschema II (vgl. Tabelle II) ist die Verträglichkeit günstiger (Ascitesmenge nach Eintritt des Todes vergleichbar mit Kontrollen), jedoch nur bei 2 maliger Applikation von je 50 mg/kg zeigt sich eine der einmaligen Gabe von 100 mg/kg vergleichbare erhöhte Überlebensrate (ILS = 21%).

5.3.1. 3-Chlor-cyclophosphamid

3-Chlor-cyclophosphamid war bereits von ZON et al. (46) in unterschiedlicher Dosierung getestet worden. Die Ergebnisse sind allerdings in keiner Weise mit den mir vorliegenden Daten kompatibel.

Innerhalb einer Testreihe wurden Mäusen bis zu 500 mg/kg appliziert, ohne daß Angaben darüber gemacht werden, inwieweit die Substanz stark toxisch wirkt. Dagegen geht aus der in Tabelle I angegebenen Standardabweichung bereits hervor, daß die durchschnittliche Überlebenszeit nur einen ungenügenden Anhaltspunkt für die Wirksamkeit darstellt. So trat der Tod in einem Fall bereits kurz (ca. 10 Min.) nach Applikation ein, in einem anderen Fall überlebte ein Tier weitaus länger als die unbehandelten Kontrolltiere. Die ausgebildete Ascitesmenge war in keinem Fall bedeutend, sodaß angenommen wird, daß die hohe Allgemeintoxizität für den Tod verantwortlich war.

In einer zweiten Testreihe wurde daher 3-Chlor-cyclophosphamid fraktioniert gegeben. Dabei ist festzustellen, daß dann aufgrund günstiger kumulativen Eigenschaften die toxische Wirkung zunimmt, ohne daß ein wesentlicher Einfluß auf die Ascitesmenge vorliegt. Aus den in Tabelle II dargestellten Werten ist ersichtlich, daß die Behandlung teilweise garnicht zu Ende geführt

Tabelle I: Test auf cancerostatische Wirksamkeit an EATC-tragenden weiblichen Mäusen, Behandlungsschema I[a]

Substanz[b]	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Tiere	Anzahl der Applikationen	Lösungsmittel[c]	Mittlere Überlebenszeit[d]	ILS%	Ascites[e]
A	-	5	1	1	16,2 ± 2,3	-	+++
B	100	5	1	1	20,4 ± 2,4	26	+
C	105,7	5	1	1	15,8 ± 6,7	-	+/-
D	142,3	5	1	2	12,7 ± 3,3	-	+++
E	125,7	5	1	2	15,3 ± 2,9	-	+++
F	147,1	5	1	2	15,9 ± 3,2	-	+++
G	114,3	5	1	2	13,4 ± 2,8	-	+++
H	131,4	5	1	2	17,7 ± 1,9	9	+++
I	129,7	5	1	2	14,2 ± 2,8	-	+++
J	500	5	1	1	12,9 ± 2,7	-	+++

[a] I = Inokulation von 10^5 Zellen i.p. am Tag 0, i.p. Applikation am Tag 3, Substanz gelöst in 0,5 ml

[b] A = Kontrolle, B = Cyclophosphamid, C = 3-Chlor-cyclophosphamid, D = 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid, E = 3-Benzyl-cyclophosphamid, F = 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid, G = 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid, H = 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid, I = 3-t-BOC-cyclophosphamid, J = 1(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino[2,1-b]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid

[c] 1 = 10% Ethanol in 0,9%iger NaCl-Lösung; 2 = 10% Ethanol/1% Tween 80 in 0,9%iger NaCl-Lösung

[d] Angabe in Tagen ± einfache Standardabweichung

[e] +++ = sehr viel; ++ = viel; + = wenig; - = kein Ascites

Tabelle II: Test auf cancerostatische Wirksamkeit an EATC-tragenden weiblichen Mäusen, Behandlungsschema II[a]

Substanz[b]	Dosis (mg/kg)	Anzahl der Tiere	Anzahl der Applikationen	Lösungs-mittel[c]	Mittlere Überlebenszeit[d]	ILS%	Ascites[e]
A	-	5	8	1	15,8 ± 2,3	-	+++
A	-	5	4	1	16,3 ± 2,1	-	+++
A	-	5	2	1	16,4 ± 2,4	-	+++
B	12,5	5	8	1	17,2 ± 2,6	9	+++
B	25	5	4	1	18,2 ± 2,1	12	+++
B	50	5	2	1	19,8 ± 2,5	21	++
C	13,2[f]	5	8	1	8,2 ± 2,6	-	++
C	26,2[f]	5	4	1	4,6 ± 1,3	-	+
C	52,8[f]	5	2	1	2,0 ± 0,8	-	-

[a] II = Inokulation von 10^5 Zellen i.p. am Tag 0, i.p. Applikation, beginnend am Tag 1, Substanz gelöst in 0,5 ml

[b-e] siehe Legende zu Tabelle I

[f] Tiere starben z.T. bereits vor Ende der Behandlung

werden konnte, da die Tiere bereits vorher starben.

Mögliche Erklärungen für die Unterschiede in den Ergebnissen von ZON und mir sind

- die von ZON dargestellte Verbindung war weniger einheitlich (keinerlei Kristallbildung), sodaß davon auszugehen ist, daß eine tatsächlich geringere Dosierung als angegeben vorliegt;
- da 3-Chlor-cyclophosphamid in Gegenwart von Reduktionsmitteln leicht zu Cyclophosphamid dehalogeniert wird, kann es zu einer entsprechenden Reaktion zwischen Lösungsmittel und Substanz gekommen sein, mit der Folge einer abnehmenden Allgemeintoxizität und zunehmender curativer Wirkung. In dem von mir verwendeten Lösungsmittel 10%iges Ethanol in 0,9%iger NaCl-Lösung war die Verbindung bis zu 1 h stabil, d.h. es konnte kein dünnschichtchromatographischer Nachweis für die Bildung von Cyclophosphamid-Anteilen erbracht werden.

5.2.3. 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid

Diese Verbindung wird, wie Cyclophosphamid (vgl. Abb. 1) im Organismus zu 3-Ethyl-4-hydroxycyclophosphamid und Thiophenol hydrolysiert. Wie aus der Arbeit von ARNOLD et al. (80) hervorgeht, wurde 3-Ethyl-cyclophosphamid bereits untersucht, die Ergebnisse jedoch nicht publiziert. Es finden sich lediglich Angaben zur cancerostatischen Wirksamkeit von 3-Methyl-cyclophosphamid, geprüft am Yoshida-Sarkom der Ratte. Danach ist die Verbindung aufgrund der hohen Toxizität (DL 50, einmalige Applikation = 50 mg/kg curativ nur unzureichend wirksam. Diese Befunde stimmen mit den von mir erhaltenen Daten überein, wenn man zusätzlich die Toxizität von Thiophenol berücksichtigt, welches u.U. synergistisch oder gar potenzierend die Wirkung von 3-Ethyl-cyclophosphamid beeinflußt.

Eine höhere Dosierung erschien in Anbetracht der Tatsache, daß die Cancerotoxizität niedrig (große Ascitesmenge), die Allgemeintoxizität hoch ist (relativ geringere Überlebenszeit als Kontrollen) wenig sinnvoll.

5.2.4. 3-Benzyl- und 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid

In derselben Arbeit (80) wurde auch 3-Benzyl-cyclophosphamid untersucht, eine curative Wirkung allerdings verneint. Die in Tabelle I aufgeführten Daten zeigen, daß dies auch für 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid gilt. Aufgrund des nur beschränkten Versuchsumfangs läßt sich aber keine weitergehende Aussage treffen.

5.2.5. 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid

Die Verbindung zeigt in der Dosierung von 114,3 mg/kg eine ausgeprägte Allgemeintoxizität, die Ascitesmenge war jedoch gegenüber den Kontrollen nicht erniedrigt. Es besteht die Möglichkeit, daß das in-vitro entstehende nicht näher untersuchte Folgeprodukt dieser Verbindung (s. Abschnitt 3.3.2.) für die Wirkungen verantwortlich ist.

5.2.6. 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid

Reaktionsprodukte der hydrolytischen sauren Spaltung von Sulfenamiden sind das Amin bzw. Amid und, über die intermediär anzunehmende Sulfensäure, das entsprechende Disulfid. D.h. in diesem Fall, daß aus 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid Cyclophosphamid und Diphenyldisulfid entstehen. Der gemessene ILS-Wert von 9% könnte z.T. durch diese Bildung von Cyclophosphamid begründet sein. Die durchschnittliche Ascitesmenge ist mit derjenigen der unbehandelten Kontrolltiere vergleichbar.

5.2.7. 3-t-BOC-cyclophosphamid

Aufgrund der Stabilität der Verbindung in Gegenwart von verdünnten Säuren ist anzunehmen, daß keinerlei Abspaltung der BOC-Gruppe stattfindet und die Allgemeintoxizität auf 3-t-BOC-cyclophosphamid zurückzuführen ist. Auch hier ist eine höhere Dosierung wenig sinnvoll, da gleichzeitig eine ungenügende Cancerotoxizität vorliegt (vergleichbare Ascitesmenge wie Kontrollen).

5.2.8. 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino- 2,1-b tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-9-oxid

Die von STEC et al. (74) und ZON et al. (77) untersuchte Verbindung wird in saurer wäßriger Lösung rasch zu N-(2-Chlorethyl)-N'-(3-phosphatopropyl)-ethylendiamin hydrolysiert, d.h. da eine derartige Reaktion auch in-vivo zu erwarten ist, handelt es sich bei dieser Verbindung nicht um ein Cyclophosphamid-Derivat.

Es wurde trotzdem in das Testprogramm mit einbezogen, da bisher lediglich das von ZON synthetisierte Produkt getestet worden war. Dieses Produkt ist, wie bereits im Rahmen der Diskussion der Synthese (s. Abschnitt 3.5.4.) nur unzureichend gereinigt gewesen. Daher stand zu vermuten, daß in dieser Form die cancerostatischen Eigenschaften ebenfalls nur bedingt charakterisiert werden konnten. Tatsächlich zeigt sich, daß die Dosierung von 500 mg/kg bereits stark toxisch ist, eine Wirkung auf die Ascitesmenge aber nicht festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend ergibt sich folgende Beurteilung:

- Die von mir angewandten Testverfahren lassen den Schluß zu, daß keine der zur Untersuchung gelangten Verbindungen eine Cyclophosphamid vergleichbare Wirkung zeigen. Offenbar ist die Wirksamkeit des Tetrahydro-2H-oxazaphosphorin-Gerüsts von einer freien N-3 Funktion abhängig. Trophosphamid, ein weiteres in der Klinik verwendetes Chemotherapeutikum, ist zwar formal als ein 3-(2-Chlorethyl)-Derivat von Cyclophosphamid aufzufassen, der Chlorethyl-Rest ist allerdings mehr als "Alkylierungsagens" denn als "passiver" funktionaler Rest aufzufassen.
- Die in der Diskussion der Methodik (Abschnitt 5.1.) skizzierten Schwierigkeiten, geeignete standardisierte Tiermodelle zur Prüfung potentieller Cancerostatika ließen sich umgehen, wenn Systeme zur Verfügung stünden, die es ermöglichen, die Wirksamkeit in-vitro zu messen. Die bisherigen in-vitro Systeme messen ausschließlich Cytotoxizität, da sie keine Differenzierung zwischen allgemeintoxischen und cancerotoxischen Effekten erlauben.

  Eine derartige Versuchsanordnung könnte aus einer Primärkultur normaler Zellen zur Messung der Allgemeintoxizität und einer Kultur der aus diesen Zellen entstandenen Tumorzellen zur Messung der Cancerotoxizität bestehen. Erst nach erfolgreichen pre-screening-Tests in diesen Systemen würde der Ganztierversuch zur weiteren Charakterisierung herangezogen, mit dem Vorteil, den doch erheblichen Tierverbrauch entscheidend einzuschränken und eher vergleichbare Aussagen treffen zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Die Synthese der folgenden Verbindungen wird beschrieben:

- Cyclophosphamid x H_2O
- 3-Benzyl-cyclophosphamid
- 3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid
- 3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid
- 3-t-BOC-cyclophosphamid

2.) Diese Verbindungen werden einer Chlorierung unterworfen. Dazu werden Cyclophosphamid bzw. seine N-3 Derivate in Chloroform gelöst und nach Zugabe von Dibenzoylperoxid und Pyridin unter Rückfluß portionsweise Chlor eingeleitet. Der Verlauf der Chlorierungsreaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. NBP-positive, neu auftretende Verbindungen werden isoliert, indem die Chlorierungsreaktion so gesteuert wird, daß ein möglichst großer Anteil des gewünschten Produkts vorliegt. Dargestellt werden konnten, durch Chlorierung von

Cyclophosphamid:
- 3-Chlor-cyclophosphamid,
- ein nicht näher charakterisierbares mehrfach substituiertes Cyclophosphamid-Dimeres;

3-(2,4-Dimethoxy)benzyl-cyclophosphamid:
- 3-Ethoxymethyl-cyclophosphamid;

3-Phenylsulfenyl-cyclophosphamid:
- ein partiell charakterisierter offenkettiger Phosphamidester.

3.) Die Chlorierungsgemische werden mit einem Mercaptan umgesetzt, indem Aliquots mit Thiophenol versetzt werden und die Produktzusammensetzung nach DC-Auftrennung mit der NBP-Reaktion überprüft werden. Neu auftretende Verbindungen werden entsprechend der für die Chlorierung angewandten Verfahren isoliert. Dargestellt werden konnte, durch Thiophenolreaktion des Chlorierungsgemischs von

Cyclophosphamid:
- 3-Ethyl-4-phenylsulfenyl-cyclophosphamid.

4.) Sämtliche Verbindungen und das als Nebenprodukt der 3-t-BOC-cyclophosphamid-Synthese auftretende 1-(2-Chlorethyl)-1,3,2-diazaphospholidino

[2,1-b]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-9-oxid werden in einem in-vivo Test am EATC-Tiermodell auf cancerostatische Wirksamkeit im Vergleich zu Cyclophosphamid untersucht.
Es konnte in keinem Fall eine Cyclophosphamid vergleichbare Wirkung der N-3 bzw. N-3/C-4 substituierten Cyclophosphamid-Derivate erzielt werden.

7. LITERATUR

1.) N.Brock & H.-J.Hohorst (1977), Z.Krebsforsch. 88, 185
2.) D.Gericke & M.Schorr (1972), "Arzneimittel, Entwicklung, Wirkung und Darstellung", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., Bd. 5, Teil II, 345
3.) H.Arnold & F.Bourseaux (1958), Angew.Chem. 70, 539
4.) N.Brock & H.-J.Hohorst (1963), Arzneim.Forsch. 13, 1021
5.) N.Brock & H.-J.Hohorst (1967), Cancer 20, 900
6.) H.M.Rauen & N.Norpoth (1967), Arzneim.Forsch. 17, 599
7.) N.E.Sladek (1971), Cancer Res. 31, 901
8.) T.A.Connors, P.L.Grover & A.M.McLoughlin (1970), Biochem.Pharmacol. 19, 153
9.) T.A.Connors, A.B.Foster, A.M.Gilsenan, M.Jarman & M.J.Tisdale (1972), Biochem.Pharmacol. 21, 1373
10.) D.L.Hill, M.C.Kirk & R.F.Struck (1970), J.Amer.Chem.Soc. 92, 3207
11.) R.F.Struck, M.C.Kirk, L.B.Mellett, S.El Dareer & D.L.Hill (1971), Molecular Pharmacol. 7, 519
12.) A.Takamizawa, Y.Tochino, Y.Hamashima & T.Iwata (1972), Chem.Pharm.Bull 20, 1612
13.) J.E.Bakke, V.J.Feil & R.G.Zaylskie (1971), J.Agr.Food Chem. 19, 788
14.) H.-J.Hohorst, A.Ziemann & N.Brock (1974), Arzneim.Forsch. 24, 1254
15.) D.L.Hill, W.R.Laster Jr. & R.F.Struck (1972), Cancer Res. 32, 658
16.) T.A.Connors, P.J.Cox, P.B.Farmer, A.B.Foster & M.Jarman (1974), Biochem. Pharmacol. 23, 115
17.) N.E.Sladek (1973), Cancer Res. 33, 651
18.) R.A.Alarcon (1964), Arch.Biochem.Biophys. 106, 240
19.) R.A.Alarcon & J.Meienhofer (1971), Nature New Biol. 233, 250
20.) M.Colvin, C.A.Padgett & C.Fenselau (1973), Cancer Res. 33, 915
21.) C.Fenselau, M.-N.N.Kan, S.Billets & M.Colvin (1975), Cancer Res. 35, 1453
22.) M.Colvin, R.B.Brundrett, M.-N.N.Kan, I.Jardine & C.Fenselau (1976), Cancer Res. 36, 1121
23.) H.-J.Hohorst, U.Draeger, G.Peter & G.Voelker (1976), Cancer Treatm.Rep. 60, 309
24.) N.Brock & H.-J.Hohorst (1977), Z.Krebsforsch. 88, 185
25.) H.Brinker (1964), Acta Pathol.Microbiol.Scand. 61, 321
26.) L.F.Larinov & I.G.Spasskaya (1968), Vop.Onkol. 14, 33
27.) H.Habs, M.Habs & D.Schmähl (1981), Arzneim.Forsch./Drug Res. 31, 530

28.) M.J.Berrigan, H.L.Gurtoo, SD.Sharma, R.F.Struck & A.J.Marinello (1980), Biochem.Biophys.Res.Com. 93, 797

29.) U.Draeger, G.Peter & H.-J.Hohorst (1976), Cancer Treatm.Rep. 60, 355

30.) G.Peter, T.Wagner & H.-J.Hohorst (1976), Cancer Treatm.Rep. 60, 429

31.) T.Hirano, W.Klesse, J.H.Heusinger, G.Lambert & H.Ringsdorf (1979), Tetrahedron Letters 10, 883

32.) D.B.P. 1025883 (1955), Farbwerke Hoechst, Erf.: H.Böhme & F.Eiden; Chemical Abstracts 1958, 14173

33.) D.B.P. 855260 (1944), Badische Anilin & Soda Fabrik, Erf.: G.Steinbrünn; Chemisches Zentralblatt 1955, 11466

34.) F.Ehrenberger & S.Gorbach (1973), "Methoden der organischen Element- und Spurenanalyse", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

35.) E.Pretsch, T.Clerc, J.Seibl & W.Simon (1981), "Strukturaufklärung organischer Verbindungen",Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

36.) E.Breitmaier & W.Voelter (1974), "^{13}C-NMR-Spectroscopy, Methods and Applications", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

37.) E.Stahl (1967), "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 842

38.) E.Müller (Hrsg.) (1962), "Methoden der organischen Chemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Band 5/3, 514

39.) B.Loev & K.M.Snader (1965), Chem.Ind. (London), 15

40.) B.Loev & M.M.Goodman (1967), Chem.Ind. (London), 2026

41.) C.Pericin (1981), Experientia 37, 6

42.) O.M.Friedman & A.M.Seligman (1954), J.Amer.Chem.Soc. 76, 655

43.) H.Arnold & F.Bourseaux (1958), Angew.Chem. 70, 539

44.) Rumänisches Patent 46621 (1964), Ministerium der chemischen Industrie, Erf.: T.Panaitescu, I.Costor, I.P.Ambdos & Z.Dumithescu; Chemical Abstracts 1968, 21519

45.) T.Kawashima, R.D.Kroshefsky, R.A.Kok & J.G.Verkade (1978), J.Org.Chem. 43, 1111

46.) G.Zon, S.M.Ludeman, G.Özkan, S.Chandrasegaran, C.F.Hammer, R.Dickerson, K. Mizuta & W.Egan (1982), The Catholic University of America, Washington, USA, unveröffentlichte Ergebnisse

47.) E.Schmitz (1961), Angew. Chem. 73, 23

48.) A.Lüttringhaus, J.Jander & R.Schneider (1959), Chem.Ber. 92, 1756

49.) J.A.Brandt, S.M.Ludeman, G.Zon, J.A.Todhunter, W.Egan & R.Dickerson (1981), J.Med.Chem. 24, 1404

50.) P.Quitt, J.Hellerbach & K.Vogler (1963), Helv.Chim.Acta 46, 327
51.) H.Lecher & F.Holschneider (1924), Chem.Ber. 57, 755
52.) L.A.Caprino, C.A.Giza & B.A.Caprino (1959), J.Amer.Chem.Soc. 81, 955
53.) R.Schwyzer, P.Sieber & H.Kapeller (1959), Helv.Chim.Acta 42, 2622
54.) G.Zon, S.M.Ludeman & W.Egan (1977), J.Amer.Chem.Soc. 99, 5785
55.) H.R.Schulten in D.Glick (Hrsg.) (1977), "Methods of Biochemical Analysis", New York-London-Sydney-Toronto, Vol. 24, 313
56.) M.Przybylski (1982), Arzneim.Forsch./Drug Res. 32, 995
57.) F.Weygand, W.Steglich, J.Bjarnason, R.Akhtar & N.M.Khan (1966), Tetrahedron Letters, 3483
58.) F.Weygand, W.Steglich, J.Bjarnason, R.Akhtar & N.Chytil (1968), Chem.Ber. 101, 3623
59.) G.C.Stelakatos & N.Argyropoulos (1966), Chem.Commun., 271
60.) T.Zincke (1911), Chem.Ber. 44, 769
61.) E.Wünsch & F.Drees (1967), Chem.Ber. 100, 816
62.) F.Weygand & E.Nintz (1965), Zeitschr.f.Naturf. 20b, 429
63.) S.Guttman & R.A.Boisonnas (1959), Helv.Chim.Acta 42, 1257
64.) L.Ruzicka (1921), Helv.Chim.Acta 4, 478
65.) M.Bergmann & L.Zervas (1932), Chem.Ber. 65, 1192
66.) S.Waley & J.Watson (1953), J.Chem.Soc., 475
67.) D.Ben-Ishai (1954), J.Org.Chem. 19, 62
68.) F.C.McKay & N.F.Albertson (1957), J.Amer.Chem.Soc. 79, 4686
69.) G.W.Anderson & A.C.McGregor (1957), J.Amer.Chem.Soc. 79, 6180
70.) R.Schwyzer, W.Rittel, H.Kappeler & B.Iselin (1960), Angew.Chem. 72, 915
71.) H.Kappeler & R.Schwyzer (1961), Helv.Chim.Acta 44, 1136
72.) D.M.Williams (1931), J.Chem.Soc., 2785
73.) S.M.McElvain & L.R.Morris (1952), J.Amer.Chem.Soc. 74, 2659
74.) K.Pankiewiecz, R.Kinas, W.J.Stec, A.B.Foster, M.Jarman & J.M.S.Van Maanen (1979), J.Amer.Chem.Soc. 101, 7712
75.) N.Brock (1958), Arzneim.Forsch. 8, 1
76.) K.Sugiura, F.A.Schmid, M.M.Schmid (1961), Cancer Res. 21, 1412
77.) S.M.Ludeman, G.Zon, W.Egan (1979), J.Med.Chem. 22, 151
78.) R.I.Geran, N.H.Greenberg, M.M.Macdonald, A.M.Schumacher & B.J.Abbott (1972), Cancer Chemother.Rep., Part 3, 3, 1
79.) M.Lane (1960), Cancer Res. 20, 1269
80.) H.Arnold, F.Bourseaux & N.Brock (1961), Arzneim.Forsch. 11, 143

LEBENSLAUF

Am 4. Februar 1951 wurde ich als Sohn der Eheleute Barbara und Richard Quack in Köln-Lindenthal geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich in Köln-Sürth, wo ich 1957 in die Volksschule eingeschult wurde. Noch im gleichen Jahr wechselte ich wegen Umzug in die Volksschule Köln-Nippes, die ich bis 1961 besuchte.

Von 1961 bis 1966 besuchte ich die Realschule Köln, Dagobertstraße, die ich mit der Mittleren Reife abschloß.

Danach folgte bis 1969 eine Lehre als Biologielaborant bei der Fa. Dr. Madaus in Köln. Von Dezember 1969 bis Februar 1970 arbeitete ich als Laborant, bis ich mich entschloß, das Köln-Kolleg zu besuchen, um das Abitur nachzuholen.

Nach bestandener Prüfung begann ich 1972 mit dem Studium der Biochemie in Tübingen.

Die Diplom-Vorprüfung 1. Teil legte ich im Oktober 1973, den 2. Teil im August 1975 ab. Der mündliche Teil der Diplom-Hauptprüfung fand im Juni 1978 statt.

Von August 1978 bis August 1979 fertigte ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Weitzel meine Diplomarbeit an mit dem Thema: "Darstellung und cytostatische Eigenschaften N-hydroxyethylierter Aminoverbindungen".

Anschließend arbeitete ich von Oktober 1979 bis Januar 1983 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Weitzel an der vorliegenden Dissertation zum Thema: "Synthese und biologische Wirksamkeit einiger Cyclophosphamid-Derivate".

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, D. Mecke, L. Flohé, H. Guglielmi, U. Weber, A. Wendel, U. Weser, K. Eisele, H. Probst
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer, M. Hanack, W. Voelter, H. Hagenmaier
Anorganische Chemie	W. Rüdorff
Physikalische Chemie	H. Mauser, W. Zeil
Physikalische Biochemie	K. Wegmann
Physik	H. Krüger, H. Gönnenwein
Mathematik	H. Pracht
Mikrobiologie	H. Zähner
Botanik	H. Metzner
Humanphysiologie	H. Betz
Zoologie	K. G. Grell, H. Möhres
Anatomie	K. Mörike
Pharmakologie	H. Remmer
Histologie	K. Mörike
Medizinische Strahlenkunde	U. Feine, E. Kallée

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 07121/45377